

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局



(43)国際公開日  
2003年7月3日 (03.07.2003)

PCT

(10)国際公開番号  
WO 03/054196 A1

(51)国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/29, 15/09, 5/14, A01H 5/00

(72)発明者; および

(21)国際出願番号: PCT/JP02/13375

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 南栄一 (MINAMI,Eiichi) [JP/JP]; 〒305-0044 茨城県つくば市並木4-9 20-2 03 Ibaraki (JP). 渋谷直人 (SHIBUYA,Naoto) [JP/JP]; 〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2 独立行政法人農業生物資源研究所内 Ibaraki (JP). デイロバートビー (DAY,Robert B.) [US/JP]; 〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2 独立行政法人農業生物資源研究所内 Ibaraki (JP).

(22)国際出願日: 2002年12月20日 (20.12.2002)

(74)代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU,Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(25)国際出願の言語: 日本語

(81)指定国(国内): AU, CA, JP, US.

(26)国際公開の言語: 日本語

(84)指定国(広域): ヨーロッパ特許 (DE, FR, GB, IT, NL, SI).

(30)優先権データ:  
特願2001-387862  
2001年12月20日 (20.12.2001) JP

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54)Title: CHITIN OLIGOSACCHARIDE ELICITOR AND GIBBERELLIN RESPONSIVE GENES IN PLANT AND UTILIZATION THEREOF

(54)発明の名称: 植物におけるキチンオリゴ糖エリシターおよびジベレリン応答遺伝子、並びに、その利用

(57)Abstract: Using DNA microchips having 1265 types of rice ESTs bonded thereto, it is attempted to search for genes the expression of which is induced at the early stage of the elicitor treatment. Use is made therein of a chitin oligomer (N-acetylchitooligosaccharide) which is one of the major constituents of *Pyricularia orizae* cell wall. As a result, 6 types of novel elicitor-responsive ESTs are identified. Products of two genes (named CIGR1 gene and CIGR2 gene), from among these ESTs, have a motif characteristic to the GRAS family considered as transcriptional factors. Thus, it has been clarified for the first time that GRAS family members other than the gibberellin signal transduction regulator exist in rice.

(57)要約:

1265種類のイネESTを貼り付けたDNAマイクロチップを用いてエリシター処理初期に発現が誘導される遺伝子を探索した。その際、イネイモチ病菌細胞壁の主要成分の一つ、キチンのオリゴマー (N-アセチルキトオリゴ糖) をエリシターとして用いた。その結果、6種類の新規エリシター応答性ESTを同定した。これらのうち、2種類の遺伝子 (CIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子と命名) の産物は、転写因子と考えられているGRASファミリーに特徴的なモチーフを備えており、イネでもジベレリンシグナル伝達制御因子以外にGRASファミリーが存在することが初めて示された。

WO 03/054196 A1

WO 03/054196 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

植物におけるキチンオリゴ糖エリシターおよびジベレリン応答遺伝子、  
並びに、その利用

技術分野

本発明は、植物におけるエリシターおよびジベレリン応答遺伝子、並びに、その利用に関する。

背景技術

DiLaurenzioら (Laurenzio, L., D., Wysocka-Diller, J., Malamy, J. E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M. G., Feldmann, K. A., and Benfey, P. N. The SCARECROW gene regulated an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell*, 1996, 86, 423-433.) はクロモソームウォーキング法により、シロイヌナズナの根および茎の断面構造形成を司る遺伝子としてScarecrowを単離しその構造を明らかにした。この遺伝子はその構造からおそらく転写因子と推定された。その後アラビドプシスのESTにこれと構造上の類似性をもつ遺伝子が多数同定されScarecrowは遺伝子ファミリーを形成していることが明らかにされた (Pysh, L. D., Wysocka-Diller, J. W., Camilleri, C., Bouchez, D., and Benfey, P. N. The GRAS gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *The Plant J.*, 1999, 18, 111-119.)。

これとは独立に、アラビドプシスにおいて植物ホルモンの一つ、ジベレリンのシグナルを負に制御する遺伝子が2種類 (GAI, RGA) 単離され、その推定アミノ酸配列のとりわけC末側約3分の2がScarecrowに有意な相同性を示すことが明らか

となつた (Peng, J., Carol, P., Richards, D. E., King, K. E., Cowling, R. J., Murphy, G. P., and Harberd, N. P. Genes and Development, 1997, 11, 3194-3205. Silverstone, A. L., Ciampaglio, C. N., and Sun, T-P. The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. The Plant Cell, 1998, 10, 155-169.)。

似たようなジベレリンのシグナル制御因子はその後トウモロコシ、コムギ (Peng, J., Richards, D. E., Hartley, N. M., Murphy, G. P., Devos, K. M., Flintham, J. E., Beales, J., Fish, L. J., Worland, A. J., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P., Snape, J. W., Gale, M. D., and Harberd, N. P. "Green revolution" genes encode mutant gibberellin response modulators. Nature, 1999, 400, 256-261.)、イネ (Ogawa, M., Kusano, T., Katsumi, M., and Sano, H. Rice gibberellin-insensitive gene homolog, OsGAI, encodes a nuclear-localized protein capable of gene activation at transcriptional level. Gene, 2000, 245, 21-29. Ikeda, A., Ueguchi-Tanaka, M., Sonoda, Y., Kitano, H., Koshioka, M., Futsuhara, Y., Matsuoka, M., and Yamaguchi, J. slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. The Plant Cell, 2001, 13, 999-1010.) で次々に単離され、構造的によく保存されていることが示された。また、トマトにおいては腋芽抑制遺伝子 (Lateral suppressor) の産物がScarecrowと同じファミリーに属することが報告された (Schumacher, K., Schmitt, T., Rossberg, M., Schmitz, G., and Theres, K. The Lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1999, 96, 290-295.)。

Pyshらはアラビドプシスで見いだされたGAI、RGA、Scarecrowの頭文字をとつ

てこれらの遺伝子ファミリーをGRASと命名した (Pysh, L. D., Wysocka-Diller, J. W., Camilleri, C., Bouchez, D., and Benfey, P. N. The GRAS gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *The Plant J.*, 1999, 18, 111-119.)。GRAS ファミリーのアミノ酸配列は、相同性の低いN末端領域、ロイシンヘプタド構造、VHID領域等によって特徴づけられる。このような構造は動物や微生物では知られておらず、植物に特有のものである。

ジベレリンシグナルの制御因子はN末端まで相同性が高く、特にDELLA配列はジベレリンのシグナルをキャッチする上で重要な働きをしていることがGAIの遺伝学的研究から明らかにされている (Herbard, N. P., King, K., E., Carol, P., Cowling, R. J., Peng, J., and Richards, D. E. *BioEssays*, 1998, 20, 1001-1008.)。

Scarecrowはそのアミノ酸配列中にロイシンジッパー型転写因子にみられる塩基性アミノ酸領域が含まれ、またN末端267アミノ酸残基中44%がグルタミン酸、セリン、スレオニン、プロリンである等のことから転写因子であろうと推定された (Laurenzio, L., D., Wysocka-Diller, J., Malamy, J. E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M. G., Feldmann, K. A., and Benfey, P. N. The SCARECROW gene regulated an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell*, 1996, 86, 423-433.)。

最近、RGAについてはGFP融合タンパク質を導入した組換え体において核に蛍光が局在することから、核に局在する転写因子であることが強く示唆された (Silverstone, A. L., Ciampaglio, C. N., and Sun, T-P. The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *The Plant Cell*, 1998, 10, 155-169.)。

一方、イネイモチ病菌細胞壁の主要成分の一つ、キチンのオリゴマー (N-ア

セチルキトオリゴ糖) がイネ培養細胞に対して種々の防御反応を低濃度で誘導する、すなわち強力なエリシター(生体防御反応を誘導する物質)として作用することが見出された (Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O., and Akatsuka, T. Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitooligosaccharides. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1993, 57, 405-409.)。その過程で、これまでにも知られていた防御関連酵素遺伝子、PAL、キチナーゼ、グルカナーゼが発現すること (He, D.-Y., Yazaki, Y., Nishizawa, Y., Takai, R., Yamada, K., Sakano, K., Shibuya, N., and Minami, E. Gene activation by cytoplasmic acidification in suspension-cultured rice cells in response to the potent elicitor, N-acethylchitoheptaose. *Mol. Plant-Microbe Int.*, 1998, 12, 1167-1174. Nishizawa, Y., Kawakami, A., Hibi, T., He, D.-Y., Shibuya, N., and Minami, E. Regulation of the chitinase gene expression in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitooligosaccharides: differences in the signal transduction pathways leading to the activation of elicitor-responsive genes. *Plant Mol. Biol.*, 1999, 39, 907-914.)、これ以外により速いタイムコースでEL2、EL3、EL5という3種の新規な初期遺伝子が発現することを見だし (Minami, E., Kuchitsu, K., He, D.-Y., Kouchi, H., Midoh, N., Ohtsuki, Y., and Shibuya, N. Two novel genes rapidly and transiently activated in suspension-cultured rice cells by treatment with N-acetylchitoheptaose, a biotic elicitor for phytoalexin production. *Plant Cell Physiol.*, 1996, 37, 563-567. Takai, R., Hasegawa, K., Kaku, K., Shibuya, N., and Minami, E. Isolation and analysis of expression mechanisms of a rice gene, EL5, which shows structural similarity to ATL family from *Arabidopsis*, in response to N-acetylchitooligosaccharide elicitor, *Plant Sci.*, 2001, 160, 577-583.)、その構造、発現特性等を明らかにしてきた。

## 発明の開示

本発明の目的は、植物における新規なエリシター応答遺伝子を同定し、該遺伝子および該遺伝子が制御された植物を提供することにある。

本発明者は、上記の課題を解決するために鋭意研究を行った。まず、エリシター応答においては、多数の遺伝子発現が変化していることが考えられることから、1265種類のイネESTを貼り付けたDNAマイクロチップを用いてエリシター処理初期に発現が誘導される遺伝子を探索した。その際、イネイモチ病菌細胞壁の主要成分の一つ、キチンのオリゴマー（N-アセチルキトオリゴ糖）をエリシターとして用いた。その結果、2種類のScarecrowファミリーのcDNAを含む6種類の新規エリシター応答性ESTを同定した。これらのうち、2種類のScarecrow様遺伝子（CIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子と命名）の産物は、GRASファミリーに特徴的なモチーフを備えており、イネでもジベレリンシグナル伝達制御因子以外にGRASファミリーが存在することが初めて示された。これら2種類の遺伝子は興味あることに、イネ懸濁培養細胞においてオーキシン非存在下ではジベレリンに応答してその発現が短時間内に誘導された。ジベレリンはentジベラン骨格をもつ化合物の総称であるが、これらの遺伝子発現誘導には活性型ジベレリンのみが有効であった。また、遺伝子発現に至るシグナル伝達過程ではタンパク質リン酸化、脱リン酸化が関与していることが示唆された。このようなジベレリンによる急激な遺伝子発現はイネ綠葉においても観察された。

エリシターは、植物において、種々の防御関連酵素遺伝子を誘導し、防御反応を引き起こすことが知られている。よって、エリシターによって誘導されるCIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子は、作物に病害抵抗性を付与するにあたり有用であることが期待される。また、ジベレリンは発芽や休眠等作物の重要形質を司るホルモンとして農業上利用されてきたがそれによって制御される転写因子は未報告であり、本遺伝子はジベレリンによる有用形質を調節した組み換え作物の作出にお

いても有用であることが期待される。

即ち、本発明は、植物におけるエリシターおよびジベレリン応答遺伝子、並びに、その利用に関し、より具体的には、

〔1〕 以下の (a) ~ (d) のいずれかに記載の植物のタンパク質をコードするDNA、

(a) 配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNA、

(b) 配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNA、

(c) 配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、

(d) 配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、

〔2〕 植物がイネである、〔1〕に記載のDNA、

〔3〕 〔1〕または〔2〕に記載のDNAがコードするタンパク質に対してドミナントネガティブな形質を有するタンパク質をコードするDNA、

〔4〕 〔1〕～〔3〕のいずれかに記載のDNAによりコードされるタンパク質

〔5〕 以下の (a) ~ (d) のいずれかに記載の核酸、

(a) 〔1〕または〔2〕に記載のDNAの転写産物と相補的なアンチセンス核酸、

(b) 〔1〕または〔2〕に記載のDNAの転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する核酸、

(c) 〔1〕または〔2〕に記載のDNAの発現を、共抑制により阻害効果を有する核酸、

(d) 〔1〕または〔2〕に記載のDNAの発現を、RNAi効果により阻害効果を

有する核酸、

[6] [1] ~ [3] のいずれかに記載のDNA、または[5]に記載の核酸を含むベクター、

[7] [1] ~ [3] のいずれかに記載のDNA、[5]に記載の核酸、または[6]に記載のベクターを保持する形質転換植物細胞、

[8] [7]に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体、

[9] イネ由来である、[8]に記載の形質転換植物体、

[10] [8]または[9]に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体、

[11] [8] ~ [10] のいずれかに記載の形質転換植物体の繁殖材料、

[12] [8] ~ [10] のいずれかに記載の形質転換植物体の製造方法であって、[1] ~ [3] のいずれかに記載のDNA、[5]に記載の核酸、または[6]に記載のベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む方法、

[13] 植物がイネである、[12]に記載の方法、を提供するものである。

本発明者は、植物における2つの新規エリシター応答遺伝子を同定し、CIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子と命名した。また、これらの遺伝子が、ジベレリンに対しても応答性を示すことを明らかにした。

本発明は、植物のCIGR1タンパク質またはCIGR2タンパク質をコードするDNAを提供する。本発明における上記植物としては、特に限定されず、例えば、穀類、野菜、および果樹等の有用農作物、観葉植物等の鑑賞用植物等が挙げられる。具体的には、該植物として、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、ナタネ、ダイズ、ワタ、トマト、ジャガイモ、キク、バラ、カーネーション、シクラメン等を例示することができる。

本発明の上記植物としては、好ましくはイネを挙げることができる。イネのCIGR1遺伝子のcDNAの塩基配列を配列番号：1に、該cDNAによってコードされるタ

ンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2に示す。また、CIGR2遺伝子のcDNAの塩基配列を配列番号：3に、該cDNAによってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：4に示す。

イネ以外の植物における本発明のDNAは、当業者においては、一般的に公知の方法により単離することが可能である。例えば、ハイブリダイゼーション技術（Southern, EM., J Mol Biol, 1975, 98, 503.）やポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術（Saiki, RK. et al., Science, 1985, 230, 1350.、Saiki, RK. et al., Science 1988, 239, 487.）を利用する方法が挙げられる。すなわち、配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAもしくはその一部をプローブとして、また配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、他の植物から配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAと高い相同意を有するDNAを単離することは、当業者にとって通常行い得ることである。このように、ハイブリダイゼーション技術やPCR技術によって単離し得る、配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAもまた、本発明のDNAに含まれる。

このようなDNAを単離するためには、好ましくはストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーション反応を行う。本発明においてストリンジェントなハイブリダイゼーション条件とは、6M尿素、0.4% SDS、0.5×SSCの条件またはこれと同等のストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件を指す。よりストリンジエンシーの高い条件、例えば、6M尿素、0.4% SDS、0.1×SSCの条件下では、より相同意の高いDNAを単離できることが期待される。こうして単離されたDNAは、アミノ酸レベルにおいて、配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列と高い相同意を有すると考えられる。高い相同意とは、アミノ酸配列全体で少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の配列の同一性を指す。

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、カーリンおよびアルチュールによるアル

ゴリズムBLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 2264-2268.、Karlin, S. & Altschul, SF., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 5873.) を用いて決定できる。BLASTのアルゴリズムに基づいたBLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul, SF. et al., J Mol Biol, 1990, 215, 403.)。BLASTNを用いて塩基配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore =100、wordlength=12とする。また、BLASTXを用いてアミノ酸配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGap ped BLASTプログラムを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

また、本発明は、上記の植物のCIGR1タンパク質およびCIGR2タンパク質と構造的に類似しているタンパク質をコードするDNAも提供する。このようなDNAとしては、該タンパク質において 1 または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAが挙げられる。

上記のDNAを調製するために、当業者によく知られた方法としては、上記ハイブリダイゼーション技術 (Southern, EM., J Mol Biol, 1975, 98, 503.) やポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術 (Saiki, RK. et al., Science, 1985, 230, 1350.、Saiki, RK. et al., Science, 1988, 239, 487.) の他に、例えば、該DNAに対し、site-directed mutagenesis法 (Kramer, W. & Fritz, HJ., Methods Enzymol, 1987, 154, 350.) により変異を導入する方法が挙げられる。また、自然界においても、塩基配列の変異によりコードするタンパク質のアミノ酸配列が変異することは起こり得ることである。また、塩基配列が変異していても、その変異がタンパク質中のアミノ酸の変異を伴わない場合（縮重変異）があり、このような縮重変異DNAも本発明に含まれる。

本発明のDNAには、ゲノムDNA、cDNA、および化学合成DNAが含まれる。ゲノムD

NAおよびcDNAの調製は、当業者にとって常套手段を利用して行うことが可能である。ゲノムDNAは、例えば、上記の植物のCIGR1タンパク質およびCIGR2タンパク質をコードする遺伝子を有する植物からゲノムDNAを抽出し、ゲノミックライブラリー（ベクターとしては、プラスミド、ファージ、コスミド、BAC、PAC等が利用できる）を作成し、これを展開して、該タンパク質をコードするDNAを基に調製したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションあるいはpla-queハイブリダイゼーションを行うことにより調製することが可能である。また、上記の植物のCIGR1タンパク質およびCIGR2タンパク質をコードするDNAに特異的なプライマーを作成し、これを利用したPCRを行うことによって調製することも可能である。また、cDNAは、例えば、該タンパク質をコードする遺伝子を有する植物から抽出したmRNAを基にcDNAを合成し、これを入ZAP等のベクターに挿入してcDNAライブラリーを作成し、これを展開して、上記と同様にコロニーハイブリダイゼーションあるいはpla-queハイブリダイゼーションを行うことにより、また、PCRを行うことにより調製することが可能である。

本発明のDNAは、例えば、組み換えタンパク質の調製や、その発現制御により表現型が改変された形質転換植物体の作出などに利用することが可能である。

組み換えタンパク質を調製する場合には、通常、本発明のDNAを適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入し、形質転換細胞を培養して発現させたタンパク質を精製する。組み換えタンパク質は、精製を容易にするなどの目的で、他のタンパク質との融合タンパク質として発現させることも可能である。例えば、大腸菌を宿主としてマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として調製する方法（米国New England BioLabs社発売のベクターpMALシリーズ）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として調製する方法（Amersham Pharmacia Biotech社発売のベクターpGEXシリーズ）、ヒスチジンタグを付加して調製する方法（Novagen社のpETシリーズ）などを利用することが可能である。宿主細胞としては、組み換えタンパク質の発現に適した細胞で

あれば特に制限はなく、上記の大腸菌の他、発現ベクターを変えることにより、例えば、酵母、種々の動植物細胞、昆虫細胞などを用いることが可能である。宿主細胞へのベクターの導入には、当業者に公知の種々の方法を用いることが可能である。例えば、大腸菌への導入には、カルシウムイオンを利用した導入方法（Mandel, M. & Higa, A., *Journal of Molecular Biology*, 1970, 53, 158-162.、Hanahan, D., *Journal of Molecular Biology*, 1983, 166, 557-580.）を用いることができる。宿主細胞内で発現させた組み換えタンパク質は、該宿主細胞またはその培養上清から、当業者に公知の方法により精製し、回収することができる。組み換えタンパク質を上記したマルトース結合タンパク質などとの融合タンパク質として発現させた場合には、容易にアフィニティー精製を行うことが可能である。このようにして作製される本発明のDNAによってコードされるタンパク質もまた、本発明に含まれる。

得られた組み換えタンパク質を用いることにより、これに結合する抗体を調製することも可能である。例えば、ポリクローナル抗体は、精製した本発明のタンパク質若しくはその一部のペプチドをウサギなどの免疫動物に免疫し、一定期間の後に血液を採取し、血ペいを除去した血清より調製することができる。また、モノクローナル抗体は、上記タンパク質若しくはペプチドで免疫した動物の抗体産生細胞と骨腫瘍細胞とを融合させ、目的とする抗体を產生する单一クローニングの細胞（ハイブリドーマ）を単離し、該細胞から抗体を得ることにより調製することができる。これにより得られた抗体は、本発明のタンパク質の精製や検出などに利用することが可能である。本発明の抗体には、抗血清、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、およびこれら抗体の断片が含まれる。

本発明のDNAを発現する形質転換植物体を作製する場合には、本発明のDNAを適当なベクターに挿入して、これを植物細胞に導入し、これにより得られた形質転換植物細胞を再生させる。

また、本発明のDNAの発現が抑制された形質転換植物体を作製する場合には、

## 12

本発明のDNAの発現を抑制するためのDNAを適当なベクターに挿入して、これを植物細胞に導入し、これにより得られた形質転換植物細胞を再生させる。「本発明のDNAの発現抑制」には、遺伝子の転写の抑制、および／またはタンパク質への翻訳の抑制が含まれる。また、DNAの発現の完全な停止のみならず発現の減少も含まれる。

本発明のDNAの発現を抑制するためのDNAの好ましい態様としては、本発明のDNAの転写産物と相補的なアンチセンス核酸、本発明のDNAの転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する核酸、RNAi効果または共抑制効果により本発明のDNAの発現を抑制する核酸、および、本発明のDNAの転写産物に対してドミナントネガティブな形質を有するタンパク質をコードするDNA等を例示することができる。本発明において「核酸」とはRNAまたはDNAを意味する。

植物における特定の内在性遺伝子の発現を抑制する方法としては、アンチセンス技術を利用する方法が当業者に最もよく利用されている。植物細胞におけるアンチセンス効果は、電気穿孔法で導入したアンチセンス核酸が植物においてアンチセンス効果を発揮することをエッカーらが示したことで初めて実証された(Ecker, JR. & Davis, RW., Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83, 5372.)。その後、タバコやペチュニアにおいてもアンチセンス核酸の発現により標的遺伝子の発現が低下した例が報告されており(van der Krol AR. et al., Nature, 1988, 333, 866.)、現在では、アンチセンス技術は植物における遺伝子発現を抑制させる手段として確立している。

アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNAポリメラーゼによって局部的に開状ループ構造が作られた部位とのハイブリッド形成による転写阻害、合成の進みつつあるRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエキソンとの接合点におけるハイブリッド形成によるスプライシング阻害、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング

阻害、mRNAとのハイブリッド形成による核から細胞質への移行阻害、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング阻害、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始阻害、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳阻害、mRNAの翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻害、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現阻害などである。このようにアンチセンス核酸は、転写、スプライシングまたは翻訳など様々な過程を阻害することで、標的遺伝子の発現を抑制する（平島および井上、新生化学実験講座2 核酸IV遺伝子の複製と発現、日本生化学会編、東京化学同人、1993、319-347.）。

本発明で用いられるアンチセンス核酸は、上記のいずれの作用により標的遺伝子の発現を抑制してもよい。一つの態様としては、遺伝子のmRNAの5'端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的と考えられる。また、コード領域もしくは3'側の非翻訳領域に相補的な配列も使用することができる。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含む核酸も、本発明で利用されるアンチセンス核酸に含まれる。使用されるアンチセンス核酸は、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは3'側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。このようにして調製された核酸は、公知の方法を用いることで、所望の植物へ形質転換できる。アンチセンス核酸の配列は、形質転換される植物が持つ内在性遺伝子またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に抑制できる限りにおいて、完全に相補的でなくてもよい。転写されたRNAは、標的遺伝子の転写産物に対して好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相補性を有する。アンチセンス核酸を用いて標的遺伝子の発現を効果的に抑制するには、アンチセンス核酸の長さは少なくとも15塩基以上であり、好ましくは100塩基以上であり、さらに好ましくは500塩基以上である。通常用いられるアンチセンス核酸

の長さは5kbよりも短く、好ましくは2.5kbよりも短い。

また、内在性遺伝子の発現の抑制は、リボザイム、またはリボザイムをコードするDNAを利用して行うことも可能である。リボザイムとは触媒活性を有するRNA分子のことを指す。リボザイムには種々の活性を有するものが存在するが、中でもRNAを切断する酵素としてのリボザイムに焦点を当てた研究により、RNAを部位特異的に切断するリボザイムの設計が可能となった。リボザイムには、グループIイントロン型やRNase Pに含まれるM1 RNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある（小泉誠および大塚栄子、蛋白質核酸酵素，1990，35，2191.）。

例えば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15という配列のC15の3'側を切断するが、その活性にはU14とA9との塩基対形成が重要とされ、C15の代わりにA15またはU15でも切断され得ることが示されている（Koizumi, M. et al., FEBS Lett, 1988, 228, 228.）。基質結合部位が標的部位近傍のRNA配列と相補的なりボザイムを設計すれば、標的RNA中のUC、UUまたはUAという配列を認識する制限酵素的なRNA切断リボザイムを作出することができる（Koizumi, M. et al., FEBS Lett, 1988, 239, 285.、小泉誠および大塚栄子、蛋白質核酸酵素, 1990, 35, 2191.、Koizumi, M. et al., Nucl Acids Res, 1989, 17, 7059.）。例えば、CIGR1遺伝子またはCIGR2遺伝子のコード領域中には、標的となり得る部位が複数存在する。

また、ヘアピン型リボザイムも本発明の目的に有用である。このリボザイムは、例えばタバコリングススポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖に見出される（Buzayan, JM., Nature, 1986, 323, 349.）。ヘアピン型リボザイムからも、標的特異的なRNA切断リボザイムを作出できることが示されている（Kikuchi, Y. & Sasaki, N., Nucl Acids Res, 1991, 19, 6751.、菊池洋、化学と生物, 1992, 30, 112.）。

標的を切断できるように設計されたリボザイムは、植物細胞中で転写されるよう、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターなどのプロモーターおよび転写終結配列に連結される。このとき、転写されたRNAの5'端や3'端に余分な配列が付加されていると、リボザイムの活性が失われることがあるが、こういった場合は、転写されたリボザイムを含むRNAからリボザイム部分だけを正確に切り出すために、リボザイム部分の5'側や3'側にシスに働く別のトリミングリボザイムを配置させることも可能である (Taira, K. et al., Protein Eng, 1990, 3, 733.、Dzianott, AM. & Bujarski, JJ., Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86, 4823.、Grosshans, CA. & Cech, TR., Nucl Acids Res, 1991, 19, 3875.、Taira, K. et al., Nucl Acids Res, 1991, 19, 5125.)。また、このような構成単位をタンデムに並べ、標的遺伝子内の複数の部位を切断できるようにすることで、より効果を高めることもできる (Yuyama, N. et al., Biochem Biophys Res Commun, 1992, 186, 1271.)。このように、リボザイムを用いて本発明における標的遺伝子の転写産物を特異的に切断することで、該遺伝子の発現を抑制することができる。

内在性遺伝子の発現の抑制は、さらに、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有する二本鎖RNAを用いたRNA干渉 (RNA interference ; RNAi) によっても行うことができる。RNAiとは、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有する二重鎖RNAを細胞内に導入すると、導入した外来遺伝子および標的内在性遺伝子の発現がいずれも抑制される現象のことを指す。RNAiの機構の詳細は明らかではないが、最初に導入した二本鎖RNAが小片に分解され、何らかの形で標的遺伝子の指標となることにより、標的遺伝子が分解されると考えられている。RNAiは植物においても効果を奏することが知られている (Chuang, CF. & Meyerowitz, EM., Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97, 4985.)。例えば、植物体におけるCIGR1遺伝子またはCIGR2遺伝子の発現をRNAiにより抑制するためには、CIGR1遺伝子もしくはCIGR2遺伝子、または、これらと類似した配列を有する二本鎖RNA

を目的の植物へ導入すればよい。RNAiに用いる遺伝子は、標的遺伝子と完全に同一である必要はないが、少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の配列の同一性を有する。また、配列の同一性は上述した手法により決定できる。

内在性遺伝子の発現の抑制は、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有するDNAの形質転換によって起こる共抑制によつても達成できる。「共抑制」とは、植物に標的内在性遺伝子と同一もしくは類似した配列を有する遺伝子を形質転換により導入すると、導入した外来遺伝子および標的内在性遺伝子の発現がいずれも抑制される現象のことを指す。共抑制の機構の詳細は明らかではないが、少なくともその機構の一部はRNAiの機構と重複していると考えられている。共抑制も植物において観察される (Smyth, DR., Curr Biol, 1997, 7, R793.、Matienssen, R., Curr Biol, 1996, 6, 810.)。例えば、CIGR1遺伝子またはCIGR2遺伝子が共抑制された植物体を得るために、CIGR1遺伝子もしくはCIGR2遺伝子、または、これらと類似した配列を有するDNAを発現できるように作製したベクターDNAを目的の植物へ形質転換すればよい。共抑制に用いる遺伝子は、標的遺伝子と完全に同一である必要はないが、少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の配列の同一性を有する。また、配列の同一性は上述した手法により決定できる。

さらに、本発明における内在性遺伝子の発現の抑制は、標的遺伝子がコードするタンパク質に対してドミナントネガティブの形質を有するタンパク質をコードする遺伝子を、植物へ形質転換することによつても達成することができる。「ドミナントネガティブの形質を有するタンパク質をコードする遺伝子」とは、該遺伝子を発現させることによって、植物体が本来持つ内在性の野生型タンパク質の活性を消失もしくは低下させる機能を有する遺伝子のことを指す。

また本発明は、上記DNAまたは核酸を含むベクター、該ベクターを保持する形質転換植物細胞、該形質転換植物細胞を含む形質転換植物体、該形質転換植物体

の子孫またはクローンである形質転換植物体、および該形質転換植物体の繁殖材料を提供する。

さらに、本発明は、上記の形質転換植物体の製造方法であって、本発明のDNAまたは核酸、あるいは本発明のベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む方法を提供する。

本発明のDNAまたは核酸の植物細胞への導入は、当業者においては、公知の方法、例えばアグロバクテリウム法、電気穿孔法（エレクトロポーレーション法）、パーティクルガン法により実施することができる。

上記アグロバクテリウム法を用いる場合、例えばNagelらの方法（Microbiol. Lett., 1990, 67, 325.）が用いられる。この方法によれば、組み換えベクターをアグロバクテリウム細菌中に形質転換して、次いで形質転換されたアグロバクテリウムを、リーフディスク法等の公知の方法により植物細胞に導入する。上記ベクターは、例えば植物体に導入した後、本発明のDNAが植物体中で発現するよう、発現プロモーターを含む。一般に、該プロモーターの下流には本発明のDNAが位置し、さらに該DNAの下流にはターミネーターが位置する。この目的に用いられる組み換えベクターは、植物への導入方法、または植物の種類に応じて、当業者によって適宜選択される。上記プロモーターとして、例えばカリフラワーモザイクウイルス由来のCaMV35S、トウモロコシのユビキチンプロモーター（特開平2-79983号公報）等を挙げることができる。

また、上記ターミネーターは、カリフラワーモザイクウイルス由来のターミネーター、あるいはノパリン合成酵素遺伝子由来のターミネーター等を例示することができるが、植物体中で機能するプロモーターやターミネーターであれば、これらに限定されない。

また、本発明のDNAまたは核酸を導入する植物は、外植片であってもよく、これらの植物から培養細胞を調製し、得られた培養細胞に導入してもよい。本発明の「植物細胞」は、例えば葉、根、茎、花および種子中の胚盤等の植物細胞、力

ルス、懸濁培養細胞等が挙げられる。

また、本発明のDNAまたは核酸の導入により形質転換した植物細胞を効率的に選択するために、上記組み換えベクターは、適当な選抜マーカー遺伝子を含む、もしくは選抜マーカー遺伝子を含むプラスミドベクターと共に植物細胞へ導入するのが好ましい。この目的に使用する選抜マーカー遺伝子は、例えば抗生物質ハイグロマイシンに耐性であるハイグロマイシンホストランスフェラーゼ遺伝子、カナマイシンまたはゲンタマイシンに耐性であるネオマイシンホストランスフェラーゼ、および除草剤ホスフィノスリシンに耐性であるアセチルトランスフェラーゼ遺伝子等が挙げられる。

組み換えベクターを導入した植物細胞は、導入された選抜マーカー遺伝子の種類に従って適当な選抜用薬剤を含む公知の選抜用培地に置床し培養する。これにより形質転換された植物培養細胞を得ることができる。

次いで、本発明のDNAまたは核酸を導入した形質転換細胞から植物体を再生する。植物体の再生は植物細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である (Toki. et al., Plant Physiol, 1995, 100, 1503-1507.)。例えばイネにおいては、形質転換植物体を作出する手法については、ポリエチレングリコールによりプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体（インド型イネ品種が適している）を再生させる方法 (Datta, S K. et al., In Gene Transfer To Plants (Potrykus I and Spangenberg Eds.), 1995, 66-74.)、電気パルスによりプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体（日本型イネ品種が適している）を再生させる方法 (Toki. et al., Plant Physiol, 1992, 100, 1503-1507.)、パーティクルガン法により細胞へ遺伝子を直接導入し、植物体を再生させる方法 (Christou, et al., Bio/technology, 1991, 9, 957-962.) およびアグロバクテリウムを介して遺伝子を導入し、植物体を再生させる方法 (Hiei. et al., Plant J, 1994, 6, 271-282.) 等、いくつかの技術が既に確立し、本願発明の技術分野において広く用いられている。本発明においては、これらの方法を好適に用いることができる。

きる。

形質転換細胞から再生させた植物体は、次いで順化用培地で培養する。その後、順化した再生植物体を、通常の栽培条件で栽培すると、植物体が得られ、成熟して結実して種子を得ることができる。

なお、このように再生され、かつ栽培した形質転換植物体中の導入された外来DNAまたは核酸の存在は、公知のPCR法やサザンハイブリダイゼーション法によって、または植物体中の核酸の塩基配列を解析することによって確認することができる。この場合、形質転換植物体からのDNAまたは核酸の抽出は、公知のJ. Sambrookらの方法 (Molecular Cloning, 第2版, Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989) に準じて実施することができる。

再生させた植物体中に存在する本発明のDNAよりなる外来遺伝子を、PCR法を用いて解析する場合には、上記のように再生植物体から抽出した核酸を鑄型として增幅反応を行う。また、本発明の核酸がDNAである場合には、該DNAの塩基配列に従って適当に選択された塩基配列をもつ合成したオリゴスクレオチドをプライマーとして用い、これらを混合させた反応液中において増幅反応を行うこともできる。増幅反応においては、DNAの変性、アニーリング、伸張反応を数十回繰り返すと、本発明のDNA配列を含むDNA断片の増幅生成物を得ることができる。増幅生成物を含む反応液を、例えばアガロース電気泳動にかけると、増幅された各種のDNA断片が分画されて、そのDNA断片が本発明のDNAに対応することを確認することが可能である。

一旦、染色体内に本発明のDNAが導入された形質転換植物体が得られれば、該植物体から有性生殖または無性生殖により子孫を得ることが可能である。また、該植物体やその子孫あるいはクローンから繁殖材料（例えば種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラスト等）を得て、それらを基に該植物体を量産することも可能である。

### 図面の簡単な説明

図1は、CIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子からコードされるアミノ酸配列とGRASファミリーとの比較を示す図である。SLR (OsGAI) はイネジベレリンシグナルリプレッサー（配列番号：5）、Tomato Lsはトマト腋芽抑制因子（配列番号：6）を示す。4種類全てで保存されているアミノ酸を\*で、3種類で保存されているアミノ酸を・で示す。

図2は、図1の続きを示す図である。

図3は、CIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子のゲノミックサザンハイブリダイゼーションの結果を示す写真である。Aは、CIGR1遺伝子を示す。Bは、CIGR2遺伝子を示す。

図4は、アミノ酸レベルでのCIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子の進化系統を示す図である。AtSCRはアラビドプシスScarecrow、AtSCLnはScarecrow様遺伝子、AtGRSはAtGAIに類似の機能不明の遺伝子、AtGRAはアラビドプシスのジベレリンシグナルリプレッサー、AtGAIはアラビドプシスのジベレリンシグナルリプレッサー（GRAとの機能分担については不明）、OsSLRはイネのジベレリンシグナルリプレッサー、Tomato Lsはトマトの腋芽抑制因子、アラビドプシスの光シグナル伝達因子、AtSCL21はアラビドプシスのScarecrow様遺伝子（機能不明）、CIGR2は本研究で報告したイネ遺伝子、AtSCL13はアラビドプシスのScarecrow様遺伝子（機能不明）、AtSCL5はアラビドプシスのScarecrow様遺伝子（機能不明）、CIGR1は本研究で報告したイネ遺伝子を示す。

図5は、CIGR1およびCIGR2遺伝子の核局在を示す写真である。35S/CIGR1/GFPまたは35S/CIGR2/GFP融合遺伝子をパーティクルガン法でタマネギ表皮細胞に導入し、レーザー共焦点顕微鏡で観察した。対照として35S/GFP融合遺伝子を用いた。aは35S/GFP、bは35S/CIGR1/GFP、cは35S/CIGR2/GFPを表す。

図6は、CIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子のキチンオリゴマーへの応答性を示す写真である。aは、キチン7量体処理による発現のタイムコース（分）を示す。

## 21

bは、キチンおよびキトサンオリゴマーの誘導活性を示す。

図7は、CIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子のGA3応答に対する2, 4Dの効果を示す写真である。時間は、GA3処理後の時間を示す。

図8は、CIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子の発現誘導に及ぼすGA3の濃度効果を示す図および写真である。aは、各濃度（単位はモル濃度）のGA3を10分間処理した後に抽出した全RNAのノーザンプロットハイブリダイゼーション法による解析結果を示す写真である。bは、イメージアナライザーによるaのシグナルの定量結果を示す図である。四角がCIGR1遺伝子、白抜き三角がCIGR2遺伝子を示す。

図9は、ジベレリンの生理活性と遺伝子発現を示す図および写真である。イネ培養細胞に活性型（GA1、GA3、GA4）、不活性型（GA13、GA17）のジベレリンを10分間処理し、全RNAを抽出した。ノーザンプロットハイブリダイゼーション法で解析した結果を写真で示す。

図10は、GA3処理後のイネ緑葉におけるCIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子の発現を示す写真である。イネ植物体にGA3をスプレー処理し、タイムコースを追つて3, 4葉をサンプリングした。3, 4葉より抽出した全RNAをノーザンプロットハイブリダイゼーション法で解析した。

図11は、エリシター応答とジベレリン応答に対するタンパク質リン酸化阻害剤の効果を示す写真である。（A）エリシター応答のポジティブコントロール、（B）オカダ酸（ $1 \mu\text{M}$ ）、（C）ラベンダスチンA（ $30 \mu\text{M}$ ）、（D）K-252-A（ $2 \mu\text{M}$ ）をキチン7量体（GN7）またはジベレリン（GA3）処理10分前に投与した。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、実施例は、下記の材料および方法に従って実施した。

（1）イネ培養細胞； イネ培養細胞は発芽イネ (*Oryza sativa* cv Nipponbare

## 22

) 種子より1PPMの2,4D(オーキシン; 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸)を含むN6寒天培地上で誘導し、N6液体培地で以下のように継代した。週に一度生体積約1ml程度の細胞を150mlのN6培地に植え継いだ。2週に一度20-meshの金網を通して細胞塊を小さくする操作を行った。ノーザンプロットのRNA抽出に供する細胞は裏ごししないで30mlの培地に植え継いだ細胞を4~6日間振とう培養したもの用いた。

(2) RNA抽出; イネ培養細胞および緑葉からの全RNA抽出はフェノールSDS法に従って行った。組織体積の約10倍以上のフェノール(水で90%程度飽和させたもの)およびこれと等量の抽出緩衝液(50 mM Tris-HCl pH9.0, 1% SDS, 50 mM NaCl)存在下ポリトリロンホモジエナイザーで組織を磨碎した。遠心分離によって得た水層を繰り返しフェノール抽出した後、0.6容のイソプロパノールを加えて攪拌し、全核酸を沈殿させた。これを水に溶かした後その0.25容の10M LiClを加えて氷冷し高分子RNAを遠心分離によって回収した。これを70%エタノールで洗浄したのち少量の水に溶解させてRNA標品とした。

(3) 培養細胞および緑葉のジベレリン処理方法; 培養細胞をあらかじめ2,4Dを含まないN6培地で数回洗浄後同じ培地に懸濁し25°Cで2時間浸透した。ジベレリン(GA3:エタノール溶液)をそれぞれの終濃度になるように加えて所定時間振とう培養後RNA抽出に供した。播種後3週間の日本晴植物体にジベレリンをスプレーで噴霧処理しタイムコースを追って3,4葉をサンプリングし、全RNAを抽出した。エリシター処理はイネ培養細胞に直接エリシター水溶液を投与することにより行った。

(4) ハイブリダイゼーション; ノーザンハイブリダイゼーションのためのRNA変性はグリオキサル法によった。10μgの全RNA(3.7 μl)に2.7μlのグリオキサル(終濃度1M)、1.6 μlのリン酸ナトリウム(pH7.0、終濃度10 mM)、8μlのジメチルスルフォキシド(終濃度50%)を加えて50°Cで1時間保温したのち1.4%アガロース(10mMリン酸ナトリウムpH7.0)中で電気泳動した。泳動後RNAをナイロ

## 23

ン膜（バイオダインA）にプロットし80℃、2時間処理をしてRNAを膜に固定した。ハイブリダイゼーションは50%フォルムアミド、0.1%SDS、0.1mg/mlサケ精子DNA、5xSSPE（0.9MNaCl、50mMリン酸ナトリウム、5mMEDTA pH7.4）、5xデンハルト溶液（0.1%牛血清アルブミン、0.1%フィコール、0.1%ポリビニルピロリドン）中で42℃一昼夜行い、その後0.1xSSC（15mMNaCl、1.5mMクエン酸ナトリウム）で、室温で5分間3回、65℃で30分間、2回洗浄した後X線フィルムに露光した。

(5) DNAマイクロアレイ解析； マイクロチップ (<http://cdna01.dna.affrc.go.jp/RMOS/index.html>)はイネゲノムプロジェクトにより1265クローンのイネESTを用いて作成された。エリシター無処理および15分処理した細胞より抽出したpoly (A) -RNAをcy5-dCTP存在下逆転写して一本鎖cDNAプローブを作成し、その結果をアレイスキャナー (Microarray scanner FLA8000 (Fujifilm)) を用いて解析した。

## [実施例1]

イネGRASファミリーのうち、ジベレリンシグナルリプレッサーと考えられる遺伝子 (SLR、OsGAI) については最近報告された (Ogawa, M., Kusano, T., Katsumi, M., and Sano, H. Rice gibberellin-insensitive gene homolog, OsGAI, encodes a nuclear-localized protein capable of gene activation at transcriptional level. *Gene*, 2000, 245, 21-29. Ikeda, A., Ueguchi-Tanaka, M., Sonoda, Y., Kitano, H., Koshioka, M., Futsuhara, Y., Matsuoka, M., and Yamaguchi, J. slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. *The Plant Cell*, 2001, 13, 999-1010. )。DNAマイクロアレイでエリシター処理15分でシグナルが有意に増加した2つのEST (c72495, AU094860) を農林水産ジーンバンクより入手して全塩基配列を解読し、両者の推定アミノ酸配列を既知のGRASファミリー遺伝子と比較した (図1およ

び図2）。両遺伝子はVHID領域を有し、C末側のアミノ酸配列はScarecrowおよびそのファミリーとの間でよく保存されていたが典型的なロイシンヘプタド構造は認められなかった。またジベレリンシグナルリプレッサーに特徴的なDELLA配列は存在しなかった。以後、C72495をCIGR1遺伝子（塩基配列を配列番号：1、アミノ酸配列を配列番号：2に記す）、AU94860をCIGR2遺伝子（塩基配列を配列番号：3、アミノ酸配列を配列番号：4に記す）と命名した。ヌクレオチドレベルでの両者の相同性は57%、アミノ酸配列レベルでの相同性は40%であった。ゲノミックサザンハイブリダイゼーションの結果、両遺伝子はそれぞれ1コピー存在するものと考えられた（図3）。

図4は両遺伝子産物ならびにこれまでに構造が明らかになったGRASファミリー遺伝子産物の推定分子進化系統を示す。CIGR2遺伝子はCIGR1遺伝子よりもむしろアラビドプシスのAtSCL5に近縁であると考えられた。またジベレリンシグナルリプレッサーは一つのサブファミリーを形成し、イネOsGAI（SLR）はCIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子よりもトウモロコシやアラビドプシスのリプレッサーにより近縁であることが示唆された。

#### [実施例2]

GRASファミリー遺伝子産物は転写調節因子であると考えられているがそれらがどのような遺伝子発現の調節に関わっているかについての知見は得られていない。アラビドプシスのScarecrowは典型的な核移行シグナルをもたないが、N末側にセリン、スレオニン、プロリン、グルタミンが多いこと等の理由から転写因子と推測された。アラビドプシスのジベレリンシグナルリプレッサーの一つ、GAIおよびそれと極めてよく似た遺伝子GRSには核移行シグナル様の配列が存在した（Peng, J., Carol, P., Richards, D. E., King, K. E., Cowling, R. J., Murphy, G. P., and Harberd, N. P. Genes and Development, 1997, 11, 3194-3205.）。またもう一つのリプレッサーであるRGAが、GFPとの融合タンパク質を用いた実験で核に局在することが示された（Silverstone, A. L., Ciampaglio, C. N.,

and Sun, T-P. The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *The Plant Cell*, 1998, 10, 155-169.)。CIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子についてその細胞内局在性を検討するためこれらの翻訳領域をGFPにin frameで連結したキメラプラスミドをパーティクルガン法によってタマネギ表皮細胞に導入し、融合タンパク質の挙動をGFPの蛍光を指標として追跡したところ、CIGR2・GFP融合タンパク質が細胞核に局在している像が観察された（図5）。またGFP単独ではそのような像は観察されなかったことから、CIGR2遺伝子産物は核に局在すると結論した。

#### [実施例3]

CIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子はいずれもDNAマイクロアレイ解析によってエリシター応答性遺伝子として同定された。そこでこれらの両遺伝子のエリシター応答性をノーザンプロットハイブリダイゼーション法によって解析した。両遺伝子ともキチン7量体処理5分後にそのmRNA量の顕著な増加が観察されはじめ90分に至るまで発現量は増加し続けた（図6 a）。キチンオリゴマーのイネに対するエリシター活性はそのサイズに依存し、7または8量体がもっとも強い活性をもつこと、脱アセチル体であるキトサンオリゴマーは活性が極めて低いことがこれまでの研究により明らかになっている。そこで1～7量体のキチンオリゴマーおよび4, 7量体のキトサンオリゴマーを処理したときのこれら両遺伝子の発現誘導を調べた。両者ともキチンの7量体にもっとも強く応答し、キトサンのオリゴマーには有意な応答を示さなかった（図6 b）。

#### [実施例4]

芦刈ら (Ashikari, M., Wu, J., Yano, M., Sasaki, T., and Yoshimura, A. Rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene Dwarf 1 encodes the alpha subunit of GTP-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999, 96, 10284-10289.)、藤澤ら (Fujisawa, Y., Kato, T., Ishikawa, A., Kitano, H., Sasaki, T., Asahi, T., and Iwasaki, Y. Suppression of the heterodi-

meric G protein causes abnormal morphology, including dwarfism, in rice.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1999, 96, 7575-7580.) は独立に、イネわい性変異体d1の原因遺伝子 (D1) が3量体型Gタンパク質  $\alpha$ サブユニットをコードしていることを見いだした。動物細胞においては3量体型Gタンパク質は7回膜貫通型受容体と共に役して細胞外の情報を伝達する重要な役割をもつことが知られている (Neer, E. J. Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. 1995, Cell 50, 1011-1019.)。

一方、エリシターシグナルの伝達過程においてはこの阻害剤あるいは活性化剤を用いた研究からその関与が示唆されている (Legendre, L., Heinsyein, P. F., and Low, P. S. Evidence for participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. J. Biol. Chem. 1992, 267, 20140-20147.) がこれらの阻害剤はその特異性が必ずしも明確でないなどの問題点が指摘されており (Ephritikhine, G., Pradier, J.-M., and Guern, J. Complexity of GTP $\gamma$ S binding to tobacco plasma membranes. Plant Physiol. Biochem. 1993, 31, 573-584.)、D1遺伝子産物の関与についても明確な結論は得られていない。

塚田らはd1系統の種子由来のカルスにおけるエリシター応答性諸反応を野生型と詳細に比較し、有意な差が認められないことを示した (Tsukada, K., Ishizaka, M., Fujisawa, Y., Iwasaki, Y., Yamaguchi, T., Minami, E., and Shibuya, N. Rice receptor for chitin oligosaccharide elicitor does not couple to heterotrimeric G-protein: Elicitor responses of suspension cultured rice cells from Daikoku dwarf (d1) mutants lacking a functional G-protein  $\alpha$ -subunit. Physiol. Plantarum, 2002, 116, 373-382)。

予備的実験の結果からCIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子のd1系統におけるエリシター誘導も野生型と同じタイムコースをたどることを確認した。

一方、上口-田中ら (Ueguchi-Tanaka, M., Fujisawa, Y., Kobayashi, M., As-

hikari, M., Iwasaki, Y., Kitano, H., and Matsuoka, M. Rice dwarf mutant d1, which is defective in the  $\alpha$  subunit of the heterotrimeric G protein, affects gibberellin signal transduction. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2000, 97, 11638-11643.) は発芽種子アリューロンにおける  $\alpha$  アミラーゼの誘導を指標として、ジベレリンのシグナル伝達にD1遺伝子が関与していることを示した。これより先にSchumacherら (Schumacher, K., Schmitt, T., Rossberg, M., Schmitz, G., and Theres, K. The Lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1999, 96, 290-295.) はトマトの腋芽抑制遺伝子の産物がScarecrowと同じ遺伝子ファミリーに属することを明らかにし、その形態形成における役割の考察においてこの遺伝子産物とジベレリンとの何らかの相互作用の可能性を指摘した。

そこでCIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子についてそのジベレリン応答性を検討した。懸濁培養細胞に活性型ジベレリンの一つGA3を処理し、タイムコースを追つてこれら両遺伝子の発現変化を解析したが、処理3時間後まで見る限りでは両遺伝子ともその発現量に有意な変化は認められなかった。培養細胞の培地には細胞の分裂能を維持するために植物によって代謝されにくいオーキシン、2,4Dが含まれている。これがジベレリンの作用を抑制している可能性が考えられたため、細胞を2,4Dを含まない培地であらかじめ洗浄した後、同じ培地中で2時間前培養し、GA3を処理したところ、処理10分後をピークとする一過的な発現が観察された(図7)。

これまで、ジベレリンシグナル伝達の研究は穀物種子のアリューロン組織における  $\alpha$  アミラーゼの誘導を指標とした解析が中心であり、培養細胞を用いた例は上記の結果が初めてである。そこでジベレリンによるCIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子の培養細胞での発現を指標としてその応答性をさらに詳細に解析した。

図8はこれら両遺伝子の発現誘導に対するGA3の濃度効果をみたものである。

両遺伝子とも $10^{-6}$ MのGA3処理によってその発現が誘導されはじめ、 $10^{-4}$ Mでほぼ飽和に達した。Vishnevetskyら (Vishnevetsky, M., Ovadis, M., Itzhaki, H., and Vainstein, A. CHRC, encoding a chromoplast-specific carotenoid-associated protein, is an early gibberellic acid-responsive gene. J. Biol. Chem. 1997, 272, 24747-24750.) はキュウリ花弁色素体のカロチノイド結合タンパク質、CHRCのジベレリンによる誘導には少なくとも $10^{-7}$ MのGA3が必要で、 $10^{-4}$ Mまではほぼ直線的に発現量が増大することを報告しており、材料、遺伝子が異なるがGA3の有効濃度に関しては似たような結果となっている。

#### [実施例5]

ジベレリンはオーキシンやサイトカイニンと異なり、生理活性ではなくentジベラン骨格をもつ化合物として定義されているため、その活性には大きな差がある。これまで述べてきたCIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子のGA3による発現誘導がその生理活性に基づくものかそれともentジベラン骨格自体にこの両遺伝子を誘導する活性があるのかを調べるために活性型 (GA1, GA3, GA4) 、不活性型 (GA13, GA17) のジベレリン (Crozier, A., Kuo, C. C., Durley, R. C., and Pharis, R. P. The biological activities of 26 gibberellins in nine plant bioassays. Canadian J. Botany 1970, 48, 867-877.) によるこれら両遺伝子の発現誘導を解析した。その結果、両遺伝子とも活性型ジベレリンによってのみその発現が誘導された (図9)。この結果はこれまで述べてきたジベレリンによるCIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子の発現誘導がジベレリンの受容体を介したシグナル伝達を介することであることを強く示唆している。

#### [実施例6]

培養細胞はオーキシン存在下で脱分化状態にあると考えられており、葉緑体をもたないために従属栄養条件下で生育するなど、植物体とは組織学的、生理学的に大きく異なるものである。したがってこれまで述べてきたCIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子のジベレリンによる誘導現象は培養細胞における特殊な現象である可

能性が否定できない。そこでイネ緑葉において両遺伝子がジベレリンにどのように応答するかを解析した。播種後3週間のイネの3,4葉にGA3 (50 μM) をスプレーしタイムコースを追って全RNAを抽出して両遺伝子の発現量変化を解析した。その結果両遺伝子ともスプレー後30分をピークとする極めて迅速な一過的発現を示した(図10)。したがって培養細胞における、ジベレリン受容体を介したシグナルは培養細胞特有のものではなく、イネ植物体においても機能していることが強く示唆された。

#### [実施例7]

Kuoら (Kuo, A., Cappelluti, S., Cervantes-Cervantes, M., Rodriguez, M., and Bush, D. S. Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, blocks calcium changes, gene expression and cell death induced by gibberellin in wheat aleurone cells. *The Plant Cell* 1996, 8, 259-269.) はコムギアリューロン層における $\alpha$ アミラーゼのジベレリンによる誘導がタンパク質脱リン酸化酵素阻害剤の一つであるオカダ酸によって特異的に阻害されることを見いだした。オカダ酸は動物のタンパク質脱リン酸化酵素のうちPP1、PP2Bを阻害することが知られている。

一方タンパク質リン酸化酵素阻害剤であるスタウロスポリン、K-252-Aはほとんど阻害しなかったことから、ジベレリンから $\alpha$ アミラーゼ遺伝子に至るシグナル伝達にはタンパク質リン酸化、特にタンパク質脱リン酸化酵素が重要な関与をしていると推測した。

一方、これまでの我々の結果ではエリシター応答性遺伝子の発現誘導はK-252-Aの前処理によって強く阻害されることが明らかになっている (He, D.-Y., Yasaki, Y., Nishizawa, Y., Takai, R., Yamada, K., Sakano, K., Shibuya, N., and Minami, E. Gene activation by cytoplasmic acidification in suspension-cultured rice cells in response to the potent elicitor, N-acetylchitohexasose. *Mol. Plant-Microbe Int.* 1998, 12, 1167-1174. Nishizawa, Y., Ka-

## 30

wakami, A., Hibi, T., He, D.-Y., Shibuya, N., and Minami, E. Regulation of the chitinase gene expression in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitooligosaccharides: differences in the signal transduction pathways leading to the activation of elicitor-responsive genes. *Plant Mol. Biol.* 1999, 39, 907-914.)。

そこでイネ培養細胞におけるCIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子のジベレリンおよびエリシターによる誘導における種々の阻害剤の影響を検討した。まずKuoらの結果を参照してオカダ酸を前処理した細胞では両遺伝子のキチン7量体による誘導はほとんど阻害されなかったのに対してGA3による誘導はほぼ完全に阻害された(図11B)ことから、イネ培養細胞におけるCIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子へのジベレリンからのシグナル伝達にはタンパク質脱リン酸化酵素の関与が推定された。つぎにタンパク質リン酸化酵素阻害剤について検討した。受容体型チロシンキナーゼの阻害剤として知られるラベンダスチンAはオカダ酸とほぼ同様の阻害を示し、キチン7量体による誘導をほとんど阻害しないのに対しGA3による誘導をほぼ完全に阻害した(図11C)。タンパク質セリン・スレオニンリン酸化酵素、タンパク質チロシンリン酸化酵素のいずれをも阻害するとされるK-252-Aは両遺伝子のキチン7量体およびGA3による誘導をほぼ完全に阻害した(図11D)。

コムギアリューロン層における $\alpha$ アミラーゼのジベレリンによる誘導はオカダ酸によって阻害されるがK-252-Aによっては阻害されないと報告されている(Kuo, A., Cappelluti, S., Cervantes-Cervantes, M., Rodriguez, M., and Bush, D. S. Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, blocks calcium changes, gene expression and cell death induced by gibberellin in wheat aleurone cells. *The Plant Cell* 1996, 8, 259-269.)。

図11の結果は、培養細胞におけるCIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子のジベレリン誘導においてもオカダ酸によって阻害されるタンパク質脱リン酸化酵素の関与

## 31

のほかに、K-252-A、ラベンダスチンAによって阻害されるタンパク質リン酸化酵素の関与を示唆するものであり、アリューロン層におけるシグナル伝達との共通性、相違点が認められた。また、ジベレリンからのシグナル伝達はキチン7量体からのものとは質的に異なると考えられる。

Richardら (Donald E. Richards, Jinrong Peng, and Nicholas P. Harberd BioEssays vol22, p573-577 (2000)) は、GRASファミリーは後生動物に幅広く見いだされる転写因子、STATに対応するものであるという仮説を提唱している。STATではC末端領域には動物の転写因子、STATファミリーに共通したSH2領域に類似した構造が見いだされる。SH2領域のC末端付近に動物のSTATでもよく保存されリン酸化を受けることが知られているチロシン残基、およびこのリン酸化チロシンと静電的に相互作用するとされるアルギニン残基が保存されている。アミノ酸配列のN-末端付近はC末端側に比べると相同性が低くなっている。これはGRASファミリーに一般的である。CIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子のヌクレオチドレベルでの相同性は57%であった。一方、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションの結果これら両遺伝子は1コピーずつ存在するものと推定された（図3）。イネのゲノムDNA 5 μgを制限酵素BamHI (B)、EcoRI (E)、HindIII (H)で完全消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後、ニトロセルロース膜に転写した。これを<sup>32</sup>Pで標識したCIGR1、CIGR2でハイブリダイズしたところcDNAのマップと一致するパターンが得られた。

のことからcDNAの全長鎖はそれぞれ対応する遺伝子産物と特異的にハイブリダイズするものと考えられた。両遺伝子ともジベレリンシグナルの負の制御因子であるGAI/RGAサブファミリーに共通するDELLA配列を有していない。

### 産業上の利用の可能性

本発明者によって、植物におけるエリシターおよびジベレリン応答植物遺伝子が提供された。エリシターは、植物において、種々の防御関連酵素遺伝子を誘導

## 3 2

し、防御反応を引き起こすことが知られている。よって、エリシターによって誘導されるCIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子は、病害抵抗性が付与された組み換え作物において有用であることが大いに期待される。

## 請求の範囲

1. 以下の (a) ~ (d) のいずれかに記載の植物のタンパク質をコードするDNA。

(a) 配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNA

(c) 配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

(d) 配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

2. 植物がイネである、請求項1に記載のDNA。

3. 請求項1または2に記載のDNAがコードするタンパク質に対してドミナントネガティブな形質を有するタンパク質をコードするDNA。

4. 請求項1~3のいずれかに記載のDNAによりコードされるタンパク質。

5. 以下の (a) ~ (d) のいずれかに記載の核酸。

(a) 請求項1または2に記載のDNAの転写産物と相補的なアンチセンス核酸

(b) 請求項1または2に記載のDNAの転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する核酸

(c) 請求項1または2に記載のDNAの発現を、共抑制により阻害効果を有する核酸

(d) 請求項1または2に記載のDNAの発現を、RNAi効果により阻害効果を有する核酸

6. 請求項1~3のいずれかに記載のDNA、または請求項5に記載の核酸を含むベクター。

## 3 4

7. 請求項 1～3 のいずれかに記載のDNA、請求項 5 に記載の核酸、または請求項 6 に記載のベクターを保持する形質転換植物細胞。
8. 請求項 7 に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体。
9. イネ由来である、請求項 8 に記載の形質転換植物体。
10. 請求項 8 または 9 に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体。
11. 請求項 8～10 のいずれかに記載の形質転換植物体の繁殖材料。
12. 請求項 8～10 のいずれかに記載の形質転換植物体の製造方法であって、請求項 1～3 のいずれかに記載のDNA、請求項 5 に記載の核酸、または請求項 6 に記載のベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む方法。
13. 植物がイネである、請求項 12 に記載の方法。

1 / 11

## 図 1

CIGR1aa	1:M-----	DLHQL---LKYRLTGANVVEIPT 22
CIGR2aa	1:M-----	1
SLR1(OsGAI) aa	1:MKREYQEAGGSSGGSSADMGSCKDKVMAGAAGEEEDVDELLAALGYKVRSSDMAD-VAQ	59
Tomato Ls aa	1:M-----	1
CIGR1aa	23:ENNMQNSPWQANPLKYEFSDSPYTPLSSQFECNL SALTNTPDNQSSTETISAQPI----	78
CIGR2aa	2:----ADTPS--RMIPHFSNIPSQNLK-QFQYSQNPKHPCHPYRAPSDTHVVPHHY--GL	52
SLR1(OsGAI) aa	60:KLEQLEMAMGMGGVSAPGAADDGF-VS-HLATDTVHYNPSDLSSWVESMLSELNAPLPI	117
Tomato Ls aa	1:-----	1
CIGR1aa	79:S PLEADSSYRQAGILLQENI QVGADPLYATSRHNMQHALRE I ETVLMAPDTDDATTSTKH	138
CIGR2aa	53:KSHSPDAGYESQATPNKYTLDSSEGAGCM--RHDSPPSQSFT-TRSGSPLSQEDSHSDST	109
SLR1(OsGAI) aa	118:PPAPPAARHASTSSTVTGGGSGFFELPAAADSSSTYALRPISLPVVATADPSAADSAR	177
Tomato Ls aa	1:-----	1
CIGR1aa	139:E FEEIKPAQLVRQRSRTWSHESRQP---LPGVGRSQFASGGYPTASYE--FRPEKRQRE	192
CIGR2aa	110:DGSPVGASCVTEDPNDLKQKL-KDLEAVML-GPDSEIVNSLENSVAN-QLSLEPEKWVRM	166
SLR1(OsGAI) aa	178:DTKRMRTGGSTSSSSSSSSLGGA SRGSVVEAPPATQGAA--ANAPAVPVVVDT	234
Tomato Ls aa	1:-----LGSGFSSSSQSHPHDEESSDHHQQRRFTATATTITTTTT 43	
CIGR1aa	193:LREDPQIIVKQLLTRCAEALSEDRTTEFHKLVQEARGVVSINGEIQRLGAYLLEGGLVAR	252
CIGR2aa	167:MGIPRGNLKELLIACARAVEEKNSFAIDMMIPELRKIVSVSGEPLERLGAYNVEGLVAR	225
SLR1(OsGAI) aa	235:QEAGIRLVHAL-L-ACAEAVQQENFAAAEALVKQIPTLAASQGGAMRKVAAYFGEALARR	292
Tomato Ls aa	44:SPA-IQIRQ-L-LISCAELISQSDFDAKRLLTILSTNSSPFGDSTERLVHQFTRALSLR	100
	. **.. . . . * . . . . * *	
CIGR1aa	253:HGNSTNI---YRALKCR---EPESKELLSYMRILYNIC---PYFKFGYMAANGAIAEA	302
CIGR2aa	226:LASSGISI---YKALKCK---EPKSSDLLSYMHFLYEAC---PYFKFGYMSANGAIAEA	275
SLR1(OsGAI)	293:VYR-----FRP-ADSTLLDAAFADL---LHAHFYE--SC-PYLKFAHFTANQAILEA	337
Tomato Ls	101:LNRYISSTTNHFMPVETTPDSSSSSLALIQSSYLSLNQVTPFIRFTQLTANQAILEA	160
	. . . . . * . * ** ** **	

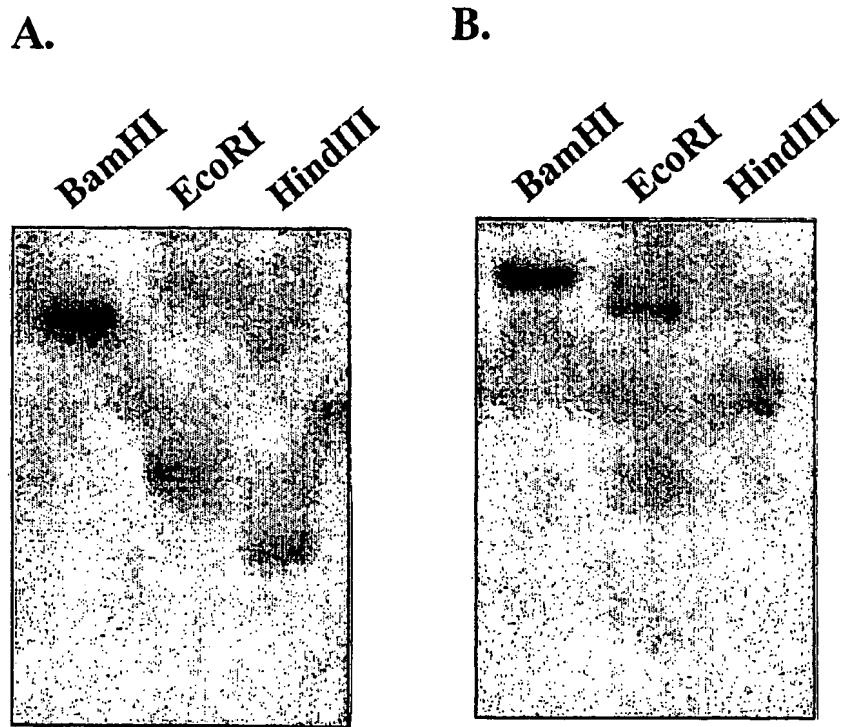
2 / 1 1

図 2

CIGR1aa	303: LRTENNIHI-IDFQIAQGTQWITL IQALAARPGGPPRV-RITGIDDPVSEYARGEGLDIV	360
CIGR2aa	276: VKGEDRIHI-IDFHISQGAQWI SLLQALAARPGGPPTV-RITGIDDSVSAYARGGLELV	333
SLR1(OsGAI) aa	338: FAGCHRV-HVVDFGIKQGMQWPALLQALRL-PGGPPSFRLTGVGPPQPDETDA--LQQV	393
Tomato Ls aa	161: INGNHQAIHI VDFDINHGVQWPPLMQALADRYPA-PT-LRITGTGN---DLDT--LRRT	212
	* * . * * * * . * * .**	* .
CIGR1aa	361: GKMLKSMSEEFKIPLEFTPLSVYATQVTKEMLEIRPGEALSVNFTL-----Q----LHH	410
CIGR2aa	334: GRRLSHIASLCKVPFEHPLAISGSKVEAAHLGVIPGEALVNFTL-----E----LHH	383
SLR1(OsGAI) aa	394: GWKLAQFAHTIRVDFQYRGLVAATLA-DLEPFMLQPEGEADANEEPEVIA-VNSVFELHR	451
Tomato Ls aa	213: GDRLAKFAHSLGLRFQFHPLYIANNHDHD---EDPSI SSI VLLPDETLAINCVFYLHR	269
	* * . . . * * . . . **	
CIGR1aa	411: TPDESVDVNNPRDGLLPDGERAVPEGDYFCRAGV-THQHNAF---LDEVWDHGVLRRHV	466
CIGR2aa	384: IPDESVSTANHRDRLLRMVKSLSPKVLTLEMESNT-NTAPFPQRFAETLDYYTAIFESI	442
SLR1(OsGAI) aa	452: LLAQPGALEKV-LGTVHAVRPRLVTVVEQEAHNNGSFLDRFTESLYYSTMFDSLEGGS	510
Tomato Ls aa	270: LLKDREKLR-IFLHRVKSMNPKITIAEKAEANHNHPLFLQRFIEALDYYTAVFDSLEA--	326
CIGR1aa	467: RVDRL--PTCRGTTTCAWS-STASP--RHIVNIIACEGKDRVERHELLGKWSRLTMA	521
CIGR2aa	443: DLT-L--P--RDDRERINMEQHCLA---REIVNLACEGEERAERYEPFGKWKARLTMA	493
SLR1(OsGAI) aa	511: SGQAELSP-PAAGGGGTDQVMSE-VYLRQICNVVACEGAERTERHETLGQWRNRLGRA	568
Tomato Ls aa	327: ---TLPP---CSR---ERMTVEQVWFGREIVDIVAMEGDKRKERHERFRSWEVMLRSC	375
	* * .. * .** * * *. * . * . *	
CIGR1aa	522: GFRPYPLSSYVNSVIRKLLACYSRK---YTLDEKGAMLLGWRSRKLISASAWH---	572
CIGR2aa	494: GFRPSPLSSLVNATIRTLQLQSYSDN---YKLAERDGALYLGWKSRLPVVSSAWH---	544
SLR1(OsGAI) aa	569: GFEPVHLGSNAYQASTLLAL-FAGGDGYRVEEKEGCLTLGWHTRPLIATSAWRVAAA	625
Tomato Ls aa	376: GFSNVAL-SPFALSQAKLLLRLHYPSEGYZQLGVSSNSFFLGWQNQPLFSISSWR---	428
	** . * .. ** * . . . *** .. * . *	

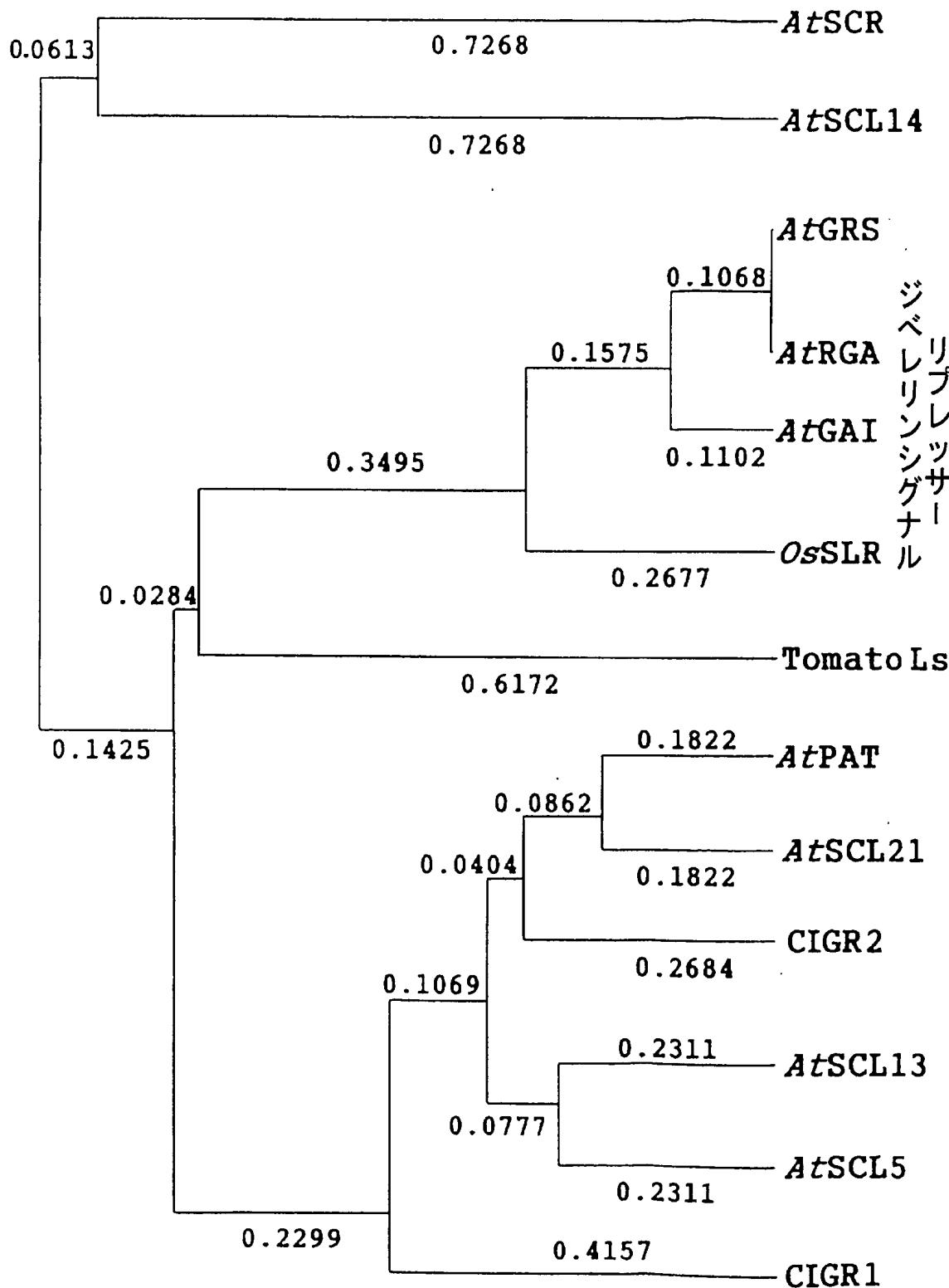
3 / 11

図 3



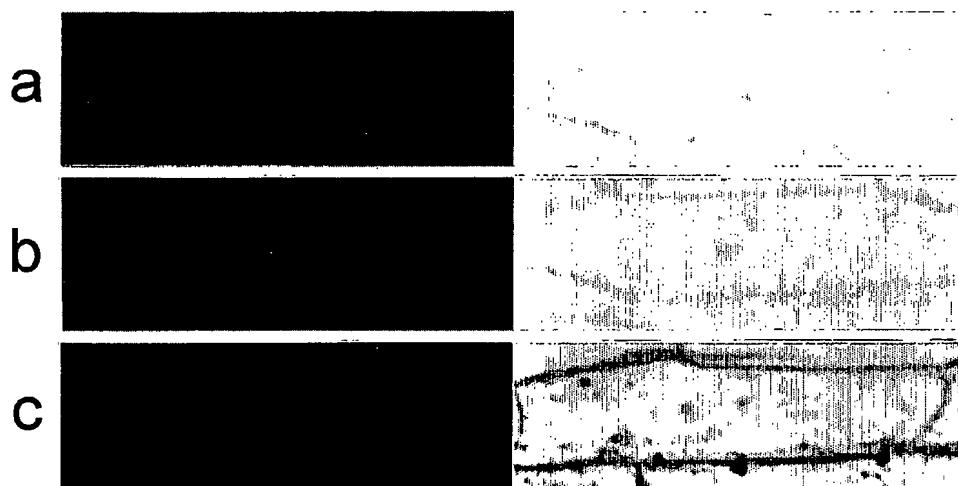
4 / 11

図 4



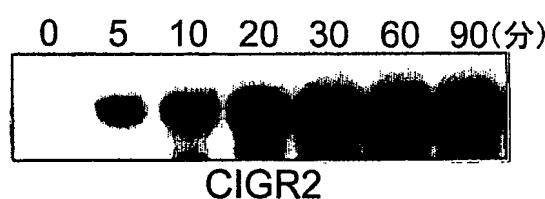
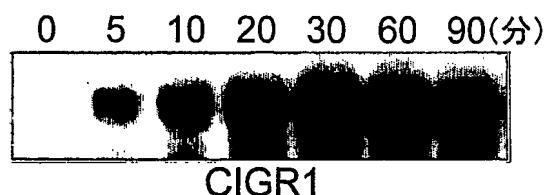
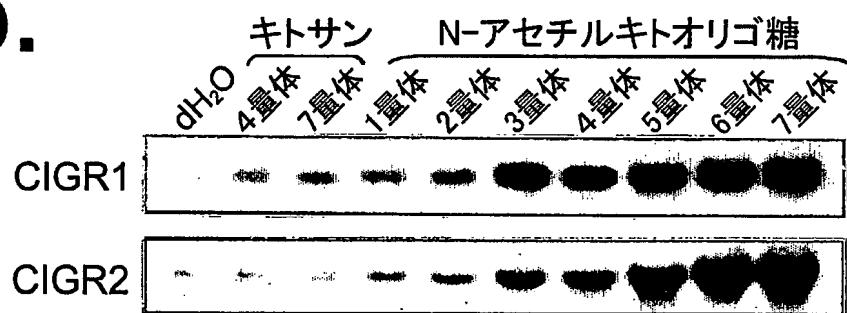
5 / 1 1

図 5



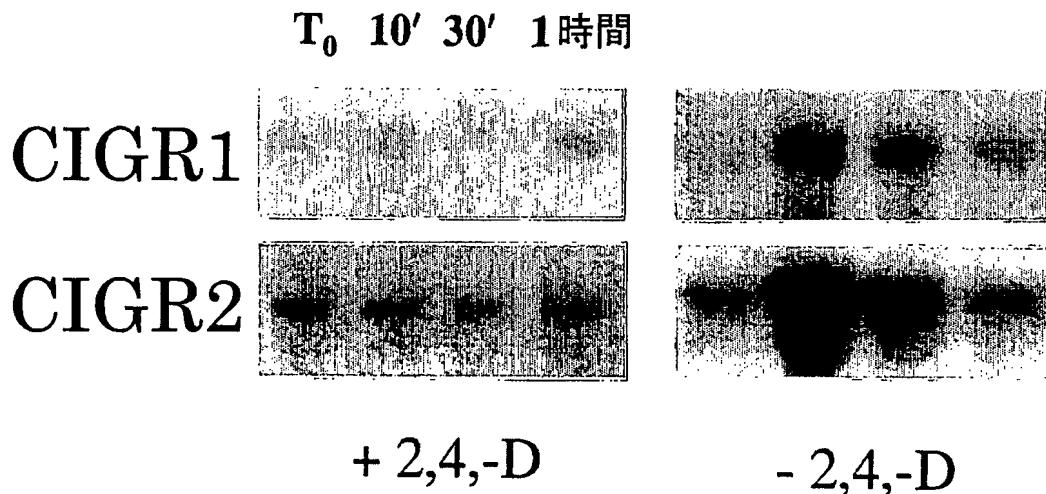
6 / 11

図 6

**a.****b.**

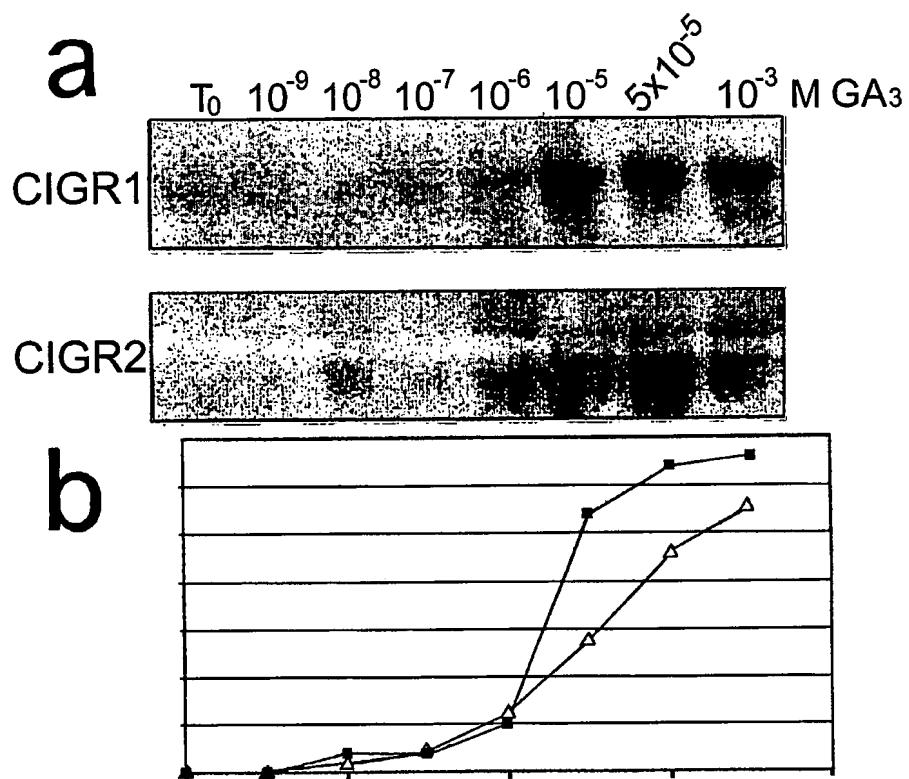
7 / 11

図 7



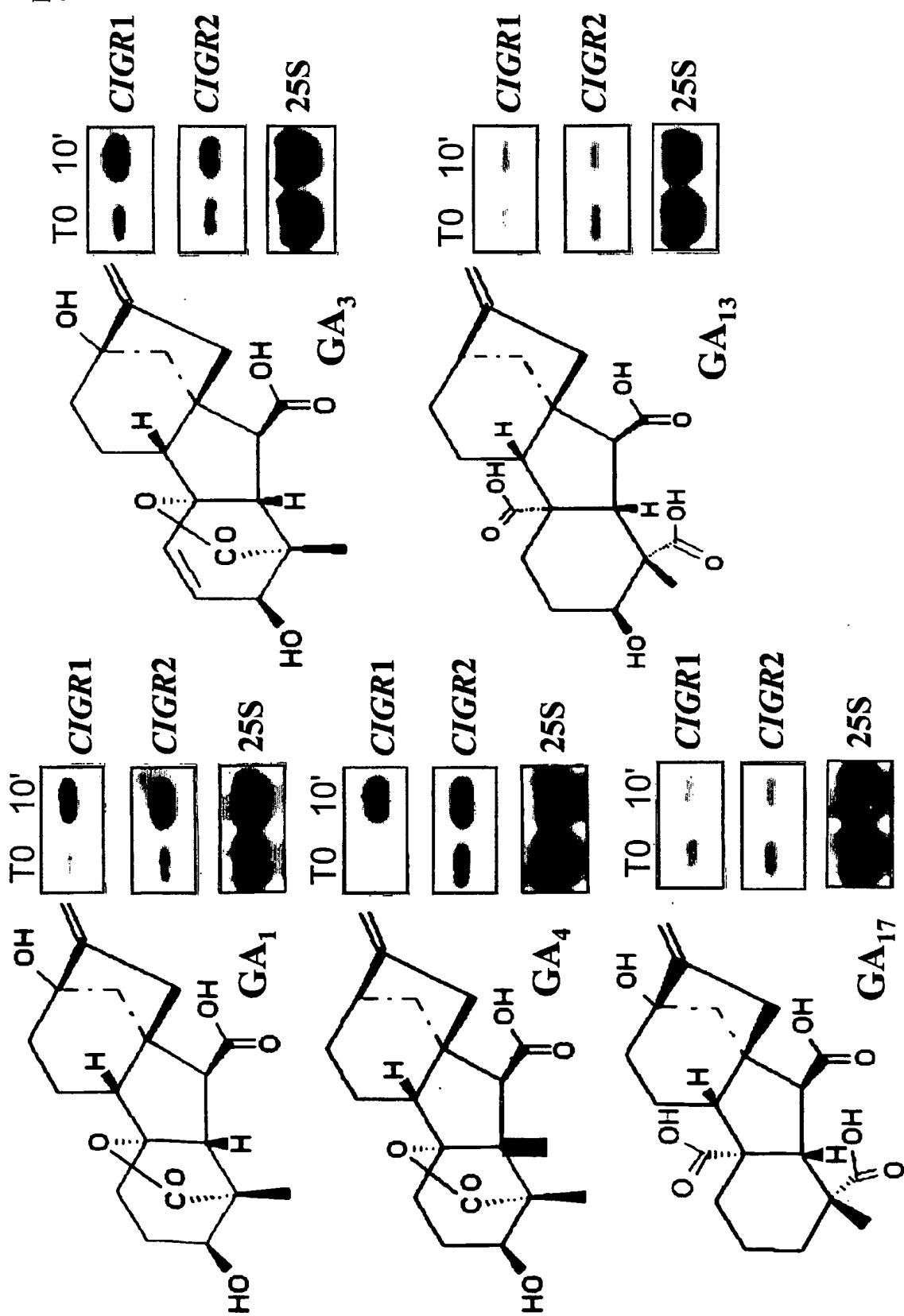
8 / 11

图 8



9 / 11

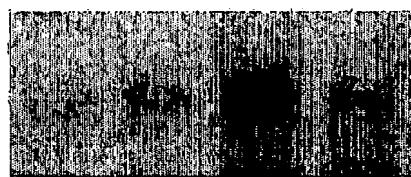
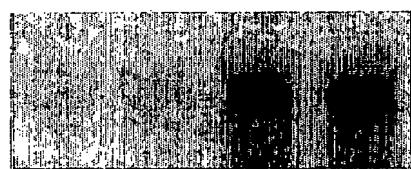
図 9



10 / 11

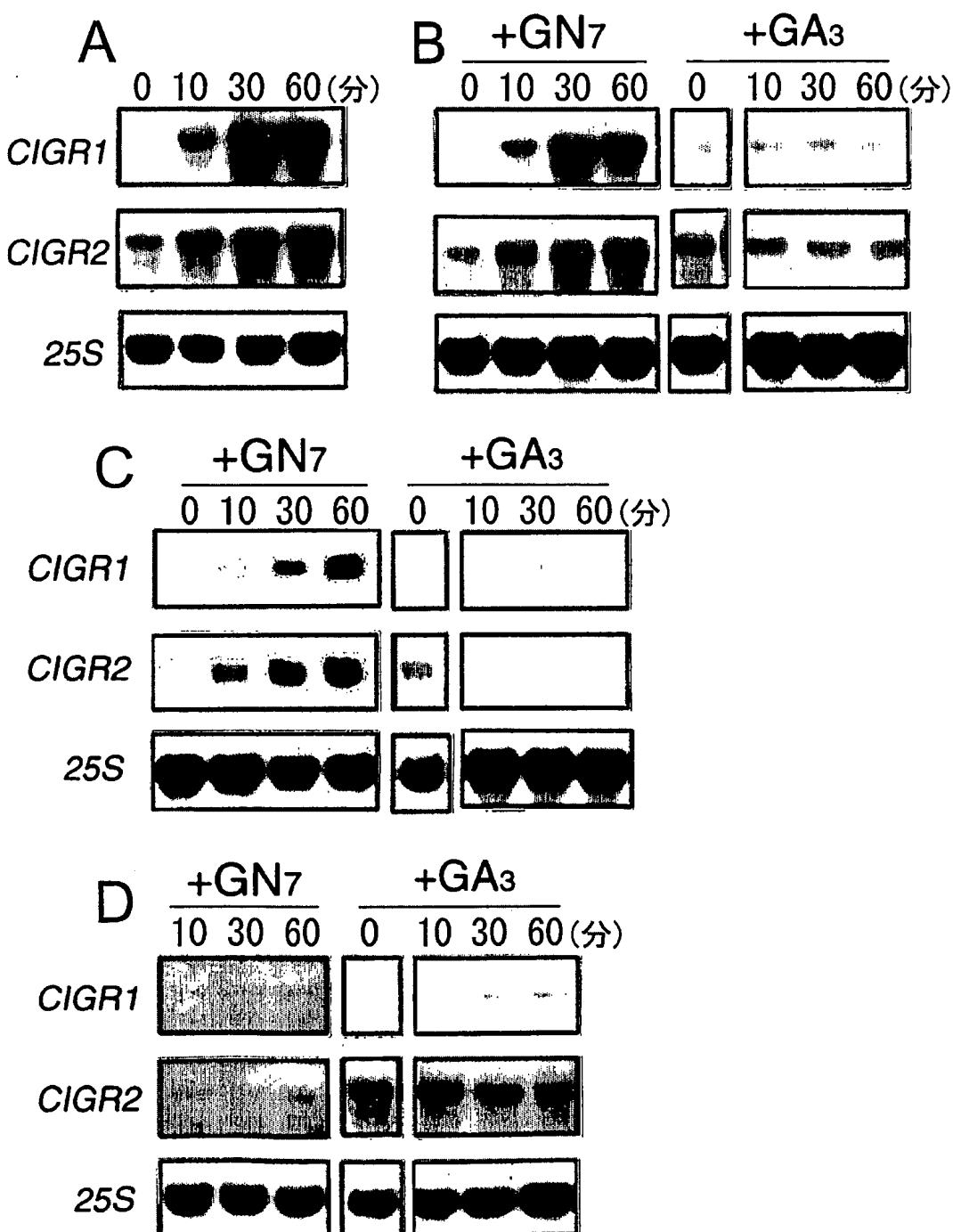
図10

0 10 30 60(分)

**CIGR1****CIGR2**

11/11

図11



1 / 3 1

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Agrobiological Sciences

<120> Isolation, characterization and use of two rice genes for transcriptional factor responsive to oligochitin elicitors and phytoactive gibberellins

<130> MOA-A0107P

<140>

<141>

<150> JP 2001-387862

<151> 2001-12-20

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2135

<212> DNA

<213> Oryza sativa L cv Nipponbare

<220>

2 / 3 1

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (137)..(1852)

&lt;400&gt; 1

gcacgagaga gaaccagaga gagagagaga gagagagaga gagagagagg agtggaaatg 60

gatcgccccca tcgtcgccgc gtcggggctg tgcagatcgg aggaggtcat gaacgactaa 120

tctccgttca ttatt atg gac ttg cac cag tta tta aag tac aga ttg act 172

Met Asp Leu His Gln Leu Leu Lys Tyr Arg Leu Thr

1 5 10

ggc gct aac gtt gtg tac gaa att cct aca gag aac aac ttg caa aac 220

Gly Ala Asn Val Val Tyr Glu Ile Pro Thr Glu Asn Asn Leu Gln Asn

15 20 25

tct ccc tgg caa gct aac cca ctg aag tac gag ttc agc gat tcc cca 268

Ser Pro Trp Gln Ala Asn Pro Leu Lys Tyr Glu Phe Ser Asp Ser Pro

30 35 40

tac acc cct ctc tct tcc caa ttt gag tgt gac aat ttg tct gct ctt 316

Tyr Thr Pro Leu Ser Ser Gln Phe Glu Cys Asp Asn Leu Ser Ala Leu

45 50 55 60

acc aac act cca gat aac cag agc tct aca gaa acc att tca gcc caa 364

Thr Asn Thr Pro Asp Asn Gln Ser Ser Thr Glu Thr Ile Ser Ala Gln

3 / 31

65 70 75

cca atc tcc cca ttg gaa gca gac agc tca tat aga cag gcg ggt att 412  
Pro Ile Ser Pro Leu Glu Ala Asp Ser Ser Tyr Arg Gln Ala Gly Ile

80 85 90

ctt ctc cag gag aac att caa gtg gga gct gat ccg ttg tat gct aca 460  
Leu Leu Gln Glu Asn Ile Gln Val Gly Ala Asp Pro Leu Tyr Ala Thr  
95 100 105

tca aga cat aat atg caa cac gcc tta cgg gag att gag act gtt ctg 508  
Ser Arg His Asn Met Gln His Ala Leu Arg Glu Ile Glu Thr Val Leu  
110 115 120

atg gca cct gat aca gat gat gca aca act agc acc aag cat gag ttt 556  
Met Ala Pro Asp Thr Asp Asp Ala Thr Thr Ser Thr Lys His Glu Phe  
125 130 135 140

gag gaa atc aag cct gct cag ctt gtg agg cag cgg tcg aga aca tgg 604  
Glu Glu Ile Lys Pro Ala Gln Leu Val Arg Gln Arg Ser Arg Thr Trp  
145 150 155

agt cat gaa tca cgg cag ccg tta cct gga gtt ggt cgg tca cag ttt 652  
Ser His Glu Ser Arg Gln Pro Leu Pro Gly Val Gly Arg Ser Gln Phe  
160 165 170

4 / 3 1

gca tct ggt gga tac ccc aca gca agc tat gaa ttt cgt cca gag aaa 700  
Ala Ser Gly Gly Tyr Pro Thr Ala Ser Tyr Glu Phe Arg Pro Glu Lys

175 180 185

cggcaaaggagttaggaa gac cct cag ata att gtg aag cag cta 748  
Arg Gln Arg Glu Leu Arg Glu Asp Pro Gln Ile Ile Val Lys Gln Leu  
190 195 200

tta acc agg tgt gag gct ctg agt gag gac agg aca gag gag ttc 796  
Leu Thr Arg Cys Ala Glu Ala Leu Ser Glu Asp Arg Thr Glu Glu Phe  
205 210 215 220

cat aag ctt gtt cag gag gct cgt gga gtg gtc tca atc aac ggg gaa 844  
His Lys Leu Val Gln Glu Ala Arg Gly Val Val Ser Ile Asn Gly Glu  
225 230 235

cca atc caa cgt cta ggt gct tac cta ctg gag ggt ttg gtt gct aga 892  
Pro Ile Gln Arg Leu Gly Ala Tyr Leu Leu Glu Gly Leu Val Ala Arg  
240 245 250

cat gga aac tct ggc aca aac atc tac cgt gct ctg aag tgc cgt gag 940  
His Gly Asn Ser Gly Thr Asn Ile Tyr Arg Ala Leu Lys Cys Arg Glu  
255 260 265

cca gag agc aag gag ctc ctg tcc tac atg aga att cta tac aat atc 988  
Pro Glu Ser Lys Glu Leu Leu Ser Tyr Met Arg Ile Leu Tyr Asn Ile

5 / 3 1

270 275 280

tgc cct tac ttc aag ttt ggc tat atg gca gcc aat ggg gcg att gca 1036

Cys Pro Tyr Phe Lys Phe Gly Tyr Met Ala Ala Asn Gly Ala Ile Ala

285 290 295 300

gaa gca ttg aga act gag aac aat atc cac ata att gat ttt cag att 1084

Glu Ala Leu Arg Thr Glu Asn Asn Ile His Ile Ile Asp Phe Gln Ile

305 310 315

gct caa ggg act caa tgg atc aca ctg ata caa gca tta gct gca agg 1132

Ala Gln Gly Thr Gln Trp Ile Thr Leu Ile Gln Ala Leu Ala Ala Arg

320 325 330

cct ggt ggt cct cct cgt gtg cggt atc acc ggg ata gat gac cca gtg 1180

Pro Gly Gly Pro Pro Arg Val Arg Ile Thr Gly Ile Asp Asp Pro Val

335 340 345

tca gag tat gct cgt ggt gaa ggt ctt gac att gtg ggg aaa atg ttg 1228

Ser Glu Tyr Ala Arg Gly Glu Gly Leu Asp Ile Val Gly Lys Met Leu

350 355 360

aaa agc atg tct gaa gaa ttc aaa ata cct ctg gag ttt acg cct ctg 1276

Lys Ser Met Ser Glu Glu Phe Lys Ile Pro Leu Glu Phe Thr Pro Leu

365 370 375 380

6 / 3 1

tct gtc tat gcc aca caa gtc acg aaa gag atg ctt gag atc agg cca 1324  
Ser Val Tyr Ala Thr Gln Val Thr Lys Glu Met Leu Glu Ile Arg Pro

385 390 395

ggt gaa gca ctg tct gta aac ttc aca ctc cag cta cac cac acc ccg 1372  
Gly Glu Ala Leu Ser Val Asn Phe Thr Leu Gln Leu His His Thr Pro

400 405 410

gac gag agc gtg gat gtc aac aac cca cgc gat ggt ctg cta ccg gat 1420  
Asp Glu Ser Val Asp Val Asn Asn Pro Arg Asp Gly Leu Leu Pro Asp

415 420 425

ggt gaa agg gct gtc ccc gaa ggt gac tac ttt ggt aga gca gga gtc 1468  
Gly Glu Arg Ala Val Pro Glu Gly Asp Tyr Phe Gly Arg Ala Gly Val

430 435 440

aca cac caa cac aac gcc ttt ctt gat gag gtt tgg gga gac cat gga 1516  
Thr His Gln His Asn Ala Phe Leu Asp Glu Val Trp Gly Asp His Gly

445 450 455 460

gta cta ctc cgc cat gtt cga gtc gat cga ctg cca acc tcg cgc ggg 1564  
Val Leu Leu Arg His Val Arg Val Asp Arg Leu Pro Thr Cys Arg Gly

465 470 475

aca aca agg aga gga tca gcg tgg agc agc act gcc tcg cca agg cac 1612  
Thr Thr Arg Arg Gly Ser Ala Trp Ser Ser Thr Ala Ser Pro Arg His

7 / 3 1

480 485 490

atc gtc aac atc atc gcc tgc gag ggg aag gac agg gtg gag agg cat 1660  
Ile Val Asn Ile Ile Ala Cys Glu Gly Lys Asp Arg Val Glu Arg His

495 500 505

gag ctg ctt ggc aag tgg aag tcg agg ctg acc atg gcc ggc ttc agg 1708  
Glu Leu Leu Gly Lys Trp Lys Ser Arg Leu Thr Met Ala Gly Phe Arg

510 515 520

cct tac ccg ttg agc tcg tac gtc aac tcg gtg ata agg aag ctt ctc 1756  
Pro Tyr Pro Leu Ser Ser Tyr Val Asn Ser Val Ile Arg Lys Leu Leu  
525 530 535 540

gcc tgc tac tcc gat aaa tac aca ttg gat gag aag gac ggc gcg atg 1804  
Ala Cys Tyr Ser Asp Lys Tyr Thr Leu Asp Glu Lys Asp Gly Ala Met

545 550 555

ctt ctc ggc tgg agg agc aga aag ctg ata tct gct tct gcg tgg cac 1852  
Leu Leu Gly Trp Arg Ser Arg Lys Leu Ile Ser Ala Ser Ala Trp His  
560 565 570

tgacagtatgt atgttgagaa gaagaaatga tagagagcat atataatacat accgattccc 1912

tggtccaatt tacagaatga tacccttta tgtaaccctca gtttgatiga cagcgggtgt 1972

8 / 3 1

tgccttcatt tatagaccag gatcaaacat tgacattaga ttgttagaga agttgtatga 2032

taataatttc ttgcgattt caatgtatga tgtatccatg gctgccatag ttaataatat 2092

tcttgcatag tcaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaa 2135

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 572

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Oryza sativa L cv Nipponbare

&lt;400&gt; 2

Met Asp Leu His Gln Leu Leu Lys Tyr Arg Leu Thr Gly Ala Asn Val

1 5 10 15

Val Tyr Glu Ile Pro Thr Glu Asn Asn Leu Gln Asn Ser Pro Trp Gln

20 25 30

Ala Asn Pro Leu Lys Tyr Glu Phe Ser Asp Ser Pro Tyr Thr Pro Leu

35 40 45

Ser Ser Gln Phe Glu Cys Asp Asn Leu Ser Ala Leu Thr Asn Thr Pro

50 55 60

Asp Asn Gln Ser Ser Thr Glu Thr Ile Ser Ala Gln Pro Ile Ser Pro

9 / 3 1

65                    70                    75                    80

Leu Glu Ala Asp Ser Ser Tyr Arg Gln Ala Gly Ile Leu Leu Gln Glu

85                    90                    95

Asn Ile Gln Val Gly Ala Asp Pro Leu Tyr Ala Thr Ser Arg His Asn

100                  105                  110

Met Gln His Ala Leu Arg Glu Ile Glu Thr Val Leu Met Ala Pro Asp

115                  120                  125

Thr Asp Asp Ala Thr Thr Ser Thr Lys His Glu Phe Glu Glu Ile Lys

130                  135                  140

Pro Ala Gln Leu Val Arg Gln Arg Ser Arg Thr Trp Ser His Glu Ser

145                  150                  155                  160

Arg Gln Pro Leu Pro Gly Val Gly Arg Ser Gln Phe Ala Ser Gly Gly

165                  170                  175

Tyr Pro Thr Ala Ser Tyr Glu Phe Arg Pro Glu Lys Arg Gln Arg Glu

180                  185                  190

Leu Arg Glu Asp Pro Gln Ile Ile Val Lys Gln Leu Leu Thr Arg Cys

195                  200                  205

10 / 31

Ala Glu Ala Leu Ser Glu Asp Arg Thr Glu Glu Phe His Lys Leu Val  
210                    215                    220

Gln Glu Ala Arg Gly Val Val Ser Ile Asn Gly Glu Pro Ile Gln Arg  
225                    230                    235                    240

Leu Gly Ala Tyr Leu Leu Glu Gly Leu Val Ala Arg His Gly Asn Ser  
245                    250                    255

Gly Thr Asn Ile Tyr Arg Ala Leu Lys Cys Arg Glu Pro Glu Ser Lys  
260                    265                    270

Glu Leu Leu Ser Tyr Met Arg Ile Leu Tyr Asn Ile Cys Pro Tyr Phe  
275                    280                    285

Lys Phe Gly Tyr Met Ala Ala Asn Gly Ala Ile Ala Glu Ala Leu Arg  
290                    295                    300

Thr Glu Asn Asn Ile His Ile Ile Asp Phe Gln Ile Ala Gln Gly Thr  
305                    310                    315                    320

Gln Trp Ile Thr Leu Ile Gln Ala Leu Ala Ala Arg Pro Gly Gly Pro  
325                    330                    335

Pro Arg Val Arg Ile Thr Gly Ile Asp Asp Pro Val Ser Glu Tyr Ala  
340                    345                    350

1 1 / 3 1

Arg Gly Glu Gly Leu Asp Ile Val Gly Lys Met Leu Lys Ser Met Ser

355                    360                    365

Glu Glu Phe Lys Ile Pro Leu Glu Phe Thr Pro Leu Ser Val Tyr Ala

370                    375                    380

Thr Gln Val Thr Lys Glu Met Leu Glu Ile Arg Pro Gly Glu Ala Leu

385                    390                    395                    400

Ser Val Asn Phe Thr Leu Gln Leu His His Thr Pro Asp Glu Ser Val

405                    410                    415

Asp Val Asn Asn Pro Arg Asp Gly Leu Leu Pro Asp Gly Glu Arg Ala

420                    425                    430

Val Pro Glu Gly Asp Tyr Phe Gly Arg Ala Gly Val Thr His Gln His

435                    440                    445

Asn Ala Phe Leu Asp Glu Val Trp Gly Asp His Gly Val Leu Leu Arg

450                    455                    460

His Val Arg Val Asp Arg Leu Pro Thr Cys Arg Gly Thr Thr Arg Arg

465                    470                    475                    480

Gly Ser Ala Trp Ser Ser Thr Ala Ser Pro Arg His Ile Val Asn Ile

12/31

485

490

495

Ile Ala Cys Glu Gly Lys Asp Arg Val Glu Arg His Glu Leu Leu Gly

500

505

510

Lys Trp Lys Ser Arg Leu Thr Met Ala Gly Phe Arg Pro Tyr Pro Leu

515

520

525

Ser Ser Tyr Val Asn Ser Val Ile Arg Lys Leu Leu Ala Cys Tyr Ser

530

535

540

Asp Lys Tyr Thr Leu Asp Glu Lys Asp Gly Ala Met Leu Leu Gly Trp

545

550

555

560

Arg Ser Arg Lys Leu Ile Ser Ala Ser Ala Trp His

565

570

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 2204

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza sativa L cv Nipponbare

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (301)..(1932)

13 / 31

&lt;400&gt; 3

cccggtccg cccacgcgtc cgccaccacct gcttcctccg cggctgcgtg cgccgccccc 60

ccaacccttc gtccctccccg ccggccgcccgttggatccg acgcgcggaa gcggagctcg 120

ctgagatttt gttcctgctg gatttctgaa attttactgg aggactagag atatcaagta 180

caccaacaac aaacttagtac aaagttttcc ttccagttaa tctgttcctg gatctccctg 240

ccatacgcga agcagtggat actatgcagt aatggtttag gaggtcttta ctgaaccata 300

atg gct gat act cca act tcc cga atg att cat ccc ttc agc aat ata 348

Met Ala Asp Thr Pro Thr Ser Arg Met Ile His Pro Phe Ser Asn Ile

1

5

10

15

ccg agc caa aac ctg aag cag ttc cag tat tct gat aat cca cag cac 396

Pro Ser Gln Asn Leu Lys Gln Phe Gln Tyr Ser Asp Asn Pro Gln His

20

25

30

cct tgc cac cct tat agg gca ccc tca gac acc cac gtt gtg cca cat 444

Pro Cys His Pro Tyr Arg Ala Pro Ser Asp Thr His Val Val Pro His

35

40

45

cat tat ggc cta aag tca cat tca ccg gat gct ggt tat gaa agc cag 492

His Tyr Gly Leu Lys Ser His Ser Pro Asp Ala Gly Tyr Glu Ser Gln

14/31

50 55 60

gct act cct aac aag tac aca ttg gac tcc tct gaa ggt gct ggt tgt 540  
Ala Thr Pro Asn Lys Tyr Thr Leu Asp Ser Ser Glu Gly Ala Gly Cys

65 70 75 80

atg aga cat gat tct cct agt caa agt ttc aca acc aga agt ggt 588  
Met Arg His Asp Ser Pro Ser Ser Gln Ser Phe Thr Thr Arg Ser Gly

85 90 95

agc cct cta tct cag gaa gac agc cac tct gac tcg act gat gga tct 636  
Ser Pro Leu Ser Gln Glu Asp Ser His Ser Asp Ser Thr Asp Gly Ser

100 105 110

cct gta ggc gcc tcc tgt gtc act gag gat cct aat gat ctg aag caa 684  
Pro Val Gly Ala Ser Cys Val Thr Glu Asp Pro Asn Asp Leu Lys Gln

115 120 125

aaa ctg aag gat ctc gag gcc gtt atg ctt ggg cca gac tcg gaa ata 732  
Lys Leu Lys Asp Leu Glu Ala Val Met Leu Gly Pro Asp Ser Glu Ile

130 135 140

gtc aac agc ctt gag aat tcg gtg gca aac caa ctt tcc ttg gag ccg 780  
Val Asn Ser Leu Glu Asn Ser Val Ala Asn Gln Leu Ser Leu Glu Pro  
145 150 155 160

15 / 31

gag aag tgg gtg cgc atg atg ggc att cct aga ggc aac ttg aaa gag 828

Glu Lys Trp Val Arg Met Met Gly Ile Pro Arg Gly Asn Leu Lys Glu

165

170

175

cta ctg att gcc tgt gct aga gct gtg gaa gag aag aat agc ttt gct 876

Leu Leu Ile Ala Cys Ala Arg Ala Val Glu Glu Lys Asn Ser Phe Ala

180

185

190

att gat atg atg att cca gag ctg aga aaa ata gtt tcg gta tct ggt 924

Ile Asp Met Met Ile Pro Glu Leu Arg Lys Ile Val Ser Val Ser Gly

195

200

205

gag cca ctt gag agg ttg gga gcc tac atg gta gaa ggg ctt gtt gcc 972

Glu Pro Leu Glu Arg Leu Gly Ala Tyr Met Val Glu Gly Leu Val Ala

210

215

220

agg ctt gcc tcc tct ggc att tca atc tac aaa gct ttg aaa tgc aag 1020

Arg Leu Ala Ser Ser Gly Ile Ser Ile Tyr Lys Ala Leu Lys Cys Lys

225

230

235

240

gaa cca aag agc tct gac ctt ctg tct tac atg cac ttc ctg tat gag 1068

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Leu Leu Ser Tyr Met His Phe Leu Tyr Glu

245

250

255

gcc tgt ccc tac ttc aag ttt ggg tat atg tcg gca aat ggt gct att 1116

Ala Cys Pro Tyr Phe Lys Phe Gly Tyr Met Ser Ala Asn Gly Ala Ile

1 6 / 3 1

260 265 270

gca gag gct gtc aag gga gaa gac agg att cat atc atc gac ttc cat 1164  
Ala Glu Ala Val Lys Gly Glu Asp Arg Ile His Ile Ile Asp Phe His

275 280 285

atc tct caa ggg gct cag tgg atc tct ctc ctt cag gcc ctt gca gcc 1212  
Ile Ser Gln Gly Ala Gln Trp Ile Ser Leu Leu Gln Ala Leu Ala Ala  
290 295 300

agg cct ggt gga cca cca act gta agg atc act ggt att gat gac tca 1260  
Arg Pro Gly Gly Pro Pro Thr Val Arg Ile Thr Gly Ile Asp Asp Ser  
305 310 315 320

gtg tca gct tac gca cga ggc ggc ggg cta gag ctg gtc gga agg agg 1308  
Val Ser Ala Tyr Ala Arg Gly Gly Leu Glu Leu Val Gly Arg Arg  
325 330 335

ctg tcg cac atc gcc agc ctg tgc aag gtg ccc ttt gaa ttc cac cca 1356  
Leu Ser His Ile Ala Ser Leu Cys Lys Val Pro Phe Glu Phe His Pro  
340 345 350

ctt gct atc tcc ggc agc aag gtg gag gca gca cat ctc gga gtc atc 1404  
Leu Ala Ile Ser Gly Ser Lys Val Glu Ala Ala His Leu Gly Val Ile  
355 360 365

17 / 31

ccc ggg gaa gcc ctc gcc gtg aac ttc acc ctg gag ctg cac cac att 1452

Pro Gly Glu Ala Leu Ala Val Asn Phe Thr Leu Glu Leu His His Ile

370

375

380

cca gac gag tcg gtg agc acg gcg aac cac cgt gac cgc ctc cta agg 1500

Pro Asp Glu Ser Val Ser Thr Ala Asn His Arg Asp Arg Leu Leu Arg

385

390

395

400

atg gtg aag agc ctg tcg ccg aag gta ctc acc ctg gtg gag atg gag 1548

Met Val Lys Ser Leu Ser Pro Lys Val Leu Thr Leu Val Glu Met Glu

405

410

415

tcc aac acg aac acg gcg cca ttc ccg cag agg ttc gcg gag acg ctg 1596

Ser Asn Thr Asn Thr Ala Pro Phe Pro Gln Arg Phe Ala Glu Thr Leu

420

425

430

gac tac tac acc gcc atc ttc gag tcc atc gac ctg acg ctg ccg agg 1644

Asp Tyr Tyr Thr Ala Ile Phe Glu Ser Ile Asp Leu Thr Leu Pro Arg

435

440

445

gac gac agg gag agg atc aac atg gag cag cac tgc ctc gcg agg gag 1692

Asp Asp Arg Glu Arg Ile Asn Met Glu Gln His Cys Leu Ala Arg Glu

450

455

460

atc gtc aac ctc atc gcg tgc gag ggg gag gag agg gcg gag cgg tac 1740

Ile Val Asn Leu Ile Ala Cys Glu Gly Glu Glu Arg Ala Glu Arg Tyr

18 / 31

465                  470                  475                  480

gag ccc ttc ggc aag tgg aag gcg cgc ctc acc atg gcc ggg ttc agg 1788  
Glu Pro Phe Gly Lys Trp Lys Ala Arg Leu Thr Met Ala Gly Phe Arg

485                  490                  495

ccg tcg ccg ctc agc tcg ctg gtg aac gcc acc atc agg acg ctg ctg 1836  
Pro Ser Pro Leu Ser Ser Leu Val Asn Ala Thr Ile Arg Thr Leu Leu

500                  505                  510

cag agc tac tcg gac aac tac aag ctc gcc gag agg gat ggg gcg ctc 1884  
Gln Ser Tyr Ser Asp Asn Tyr Lys Leu Ala Glu Arg Asp Gly Ala Leu

515                  520                  525

tac ctc ggg tgg aag agc agg ccc ctg gtg gtc tcg tcg gcg tgg cac 1932  
Tyr Leu Gly Trp Lys Ser Arg Pro Leu Val Val Ser Ser Ala Trp His

530                  535                  540

tagcgttgtg acttttgtgag gtgatctgac gacgaacttc ctttgtaacc atcttggctg 1992

ggggctttag aaagctatag tgatcatgga ctggtaaggg tagctgttaac aatggtgttg 2052

taatggtaag gtancggctaa gggtaaaact cgaaaatggg caaaaatgctg atnaggta 2112

naagtgttagt acatgtttta nagtatatgt ttcatgtttt cttttaaaaa aaaaaaaaaa 2172

19 / 31

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aa

2204

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 544

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Oryza sativa cv Nipponbare

&lt;400&gt; 4

Met Ala Asp Thr Pro Thr Ser Arg Met Ile His Pro Phe Ser Asn Ile

1 5 10 15

Pro Ser Gln Asn Leu Lys Gln Phe Gln Tyr Ser Asp Asn Pro Gln His

20 25 30

Pro Cys His Pro Tyr Arg Ala Pro Ser Asp Thr His Val Val Pro His

35 40 45

His Tyr Gly Leu Lys Ser His Ser Pro Asp Ala Gly Tyr Glu Ser Gln

50 55 60

Ala Thr Pro Asn Lys Tyr Thr Leu Asp Ser Ser Glu Gly Ala Gly Cys

65 70 75 80

Met Arg His Asp Ser Pro Ser Ser Gln Ser Phe Thr Thr Arg Ser Gly

85 90 95

20 / 31

Ser Pro Leu Ser Gln Glu Asp Ser His Ser Asp Ser Thr Asp Gly Ser

100

105

110

Pro Val Gly Ala Ser Cys Val Thr Glu Asp Pro Asn Asp Leu Lys Gln

115

120

125

Lys Leu Lys Asp Leu Glu Ala Val Met Leu Gly Pro Asp Ser Glu Ile

130

135

140

Val Asn Ser Leu Glu Asn Ser Val Ala Asn Gln Leu Ser Leu Glu Pro

145

150

155

160

Glu Lys Trp Val Arg Met Met Gly Ile Pro Arg Gly Asn Leu Lys Glu

165

170

175

Leu Leu Ile Ala Cys Ala Arg Ala Val Glu Glu Lys Asn Ser Phe Ala

180

185

190

Ile Asp Met Met Ile Pro Glu Leu Arg Lys Ile Val Ser Val Ser Gly

195

200

205

Glu Pro Leu Glu Arg Leu Gly Ala Tyr Met Val Glu Gly Leu Val Ala

210

215

220

Arg Leu Ala Ser Ser Gly Ile Ser Ile Tyr Lys Ala Leu Lys Cys Lys

21 / 31

225                    230                    235                    240

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Leu Leu Ser Tyr Met His Phe Leu Tyr Glu

245                    250                    255

Ala Cys Pro Tyr Phe Lys Phe Gly Tyr Met Ser Ala Asn Gly Ala Ile

260                    265                    270

Ala Glu Ala Val Lys Gly Glu Asp Arg Ile His Ile Ile Asp Phe His

275                    280                    285

Ile Ser Gln Gly Ala Gln Trp Ile Ser Leu Leu Gln Ala Leu Ala Ala

290                    295                    300

Arg Pro Gly Gly Pro Pro Thr Val Arg Ile Thr Gly Ile Asp Asp Ser

305                    310                    315                    320

Val Ser Ala Tyr Ala Arg Gly Gly Gly Leu Glu Leu Val Gly Arg Arg

325                    330                    335

Leu Ser His Ile Ala Ser Leu Cys Lys Val Pro Phe Glu Phe His Pro

340                    345                    350

Leu Ala Ile Ser Gly Ser Lys Val Glu Ala Ala His Leu Gly Val Ile

355                    360                    365

22 / 31

Pro Gly Glu Ala Leu Ala Val Asn Phe Thr Leu Glu Leu His His Ile  
370                    375                    380

Pro Asp Glu Ser Val Ser Thr Ala Asn His Arg Asp Arg Leu Leu Arg  
385                    390                    395                    400

Met Val Lys Ser Leu Ser Pro Lys Val Leu Thr Leu Val Glu Met Glu  
405                    410                    415

Ser Asn Thr Asn Thr Ala Pro Phe Pro Gln Arg Phe Ala Glu Thr Leu  
420                    425                    430

Asp Tyr Tyr Thr Ala Ile Phe Glu Ser Ile Asp Leu Thr Leu Pro Arg  
435                    440                    445

Asp Asp Arg Glu Arg Ile Asn Met Glu Gln His Cys Leu Ala Arg Glu  
450                    455                    460

Ile Val Asn Leu Ile Ala Cys Glu Gly Glu Glu Arg Ala Glu Arg Tyr  
465                    470                    475                    480

Glu Pro Phe Gly Lys Trp Lys Ala Arg Leu Thr Met Ala Gly Phe Arg  
485                    490                    495

Pro Ser Pro Leu Ser Ser Leu Val Asn Ala Thr Ile Arg Thr Leu Leu  
500                    505                    510

23 / 31

Gln Ser Tyr Ser Asp Asn Tyr Lys Leu Ala Glu Arg Asp Gly Ala Leu

515

520

525

Tyr Leu Gly Trp Lys Ser Arg Pro Leu Val Val Ser Ser Ala Trp His

530

535

540

<210> 5

<211> 625

<212> PRT

<213> Oryza sativa L cv Nipponbare

<400> 5

Met Lys Arg Glu Tyr Gln Glu Ala Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser

1

5

10

15

Ser Ala Asp Met Gly Ser Cys Lys Asp Lys Val Met Ala Gly Ala Ala

20

25

30

Gly Glu Glu Glu Asp Val Asp Glu Leu Leu Ala Ala Leu Gly Tyr Lys

35

40

45

Val Arg Ser Ser Asp Met Ala Asp Val Ala Gln Lys Leu Glu Gln Leu

50

55

60

2 4 / 3 1

Glu Met Ala Met Gly Met Gly Gly Val Ser Ala Pro Gly Ala Ala Asp

65 70 75 80

Asp Gly Phe Val Ser His Leu Ala Thr Asp Thr Val His Tyr Asn Pro

85 90 95

Ser Asp Leu Ser Ser Trp Val Glu Ser Met Leu Ser Glu Leu Asn Ala

100 105 110

Pro Leu Pro Pro Ile Pro Pro Ala Pro Pro Ala Ala Arg His Ala Ser

115 120 125

Thr Ser Ser Thr Val Thr Gly Gly Gly Ser Gly Phe Phe Glu Leu

130 135 140

Pro Ala Ala Ala Asp Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Ala Leu Arg Pro Ile

145 150 155 160

Ser Leu Pro Val Val Ala Thr Ala Asp Pro Ser Ala Ala Asp Ser Ala

165 170 175

Arg Asp Thr Lys Arg Met Arg Thr Gly Gly Gly Ser Thr Ser Ser Ser

180 185 190

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Gly Gly Gly Ala Ser Arg Gly Ser Val

195 200 205

25 / 31

Val Glu Ala Ala Pro Pro Ala Thr Gln Gly Ala Ala Ala Asn Ala

210

215

220

Pro Ala Val Pro Val Val Val Val Asp Thr Gln Glu Ala Gly Ile Arg

225

230

235

240

Leu Val His Ala Leu Leu Ala Cys Ala Glu Ala Val Gln Gln Glu Asn

245

250

255

Phe Ala Ala Ala Glu Ala Leu Val Lys Gln Ile Pro Thr Leu Ala Ala

260

265

270

Ser Gln Gly Gly Ala Met Arg Lys Val Ala Ala Tyr Phe Gly Glu Ala

275

280

285

Leu Ala Arg Arg Val Tyr Arg Phe Arg Pro Ala Asp Ser Thr Leu Leu

290

295

300

Asp Ala Ala Phe Ala Asp Leu Leu His Ala His Phe Tyr Glu Ser Cys

305

310

315

320

Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe Thr Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu

325

330

335

Ala Phe Ala Gly Cys His Arg Val His Val Val Asp Phe Gly Ile Lys

2 6 / 3 1

340 345 350

Gln Gly Met Gln Trp Pro Ala Leu Leu Gln Ala Leu Ala Leu Arg Pro

355 360 365

Gly Gly Pro Pro Ser Phe Arg Leu Thr Gly Val Gly Pro Pro Gln Pro

370 375 380

Asp Glu Thr Asp Ala Leu Gln Gln Val Gly Trp Lys Leu Ala Gln Phe

385 390 395 400

Ala His Thr Ile Arg Val Asp Phe Gln Tyr Arg Gly Leu Val Ala Ala

405 410 415

Thr Leu Ala Asp Leu Glu Pro Phe Met Leu Gln Pro Glu Gly Glu Ala

420 425 430

Asp Ala Asn Glu Glu Pro Glu Val Ile Ala Val Asn Ser Val Phe Glu

435 440 445

Leu His Arg Leu Leu Ala Gln Pro Gly Ala Leu Glu Lys Val Leu Gly

450 455 460

Thr Val His Ala Val Arg Pro Arg Ile Val Thr Val Val Glu Gln Glu

465 470 475 480

27 / 31

Ala Asn His Asn Ser Gly Ser Phe Leu Asp Arg Phe Thr Glu Ser Leu

485

490

495

His Tyr Tyr Ser Thr Met Phe Asp Ser Leu Glu Gly Gly Ser Ser Gly

500

505

510

Gln Ala Glu Leu Ser Pro Pro Ala Ala Gly Gly Gly Gly Thr Asp

515

520

525

Gln Val Met Ser Glu Val Tyr Leu Gly Arg Gln Ile Cys Asn Val Val

530

535

540

Ala Cys Glu Gly Ala Glu Arg Thr Glu Arg His Glu Thr Leu Gly Gln

545

550

555

560

Trp Arg Asn Arg Leu Gly Arg Ala Gly Phe Glu Pro Val His Leu Gly

565

570

575

Ser Asn Ala Tyr Lys Gln Ala Ser Thr Leu Leu Ala Leu Phe Ala Gly

580

585

590

Gly Asp Gly Tyr Arg Val Glu Glu Lys Glu Gly Cys Leu Thr Leu Gly

595

600

605

Trp His Thr Arg Pro Leu Ile Ala Thr Ser Ala Trp Arg Val Ala Ala

610

615

620

28 / 31

Ala

625

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 427

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lycopersicon esculentum

&lt;400&gt; 6

Leu Gly Ser Phe Gly Ser Ser Ser Ser Gln Ser His Pro His His Asp

1 5 10 15

Glu Glu Ser Ser Asp His His Gln Gln Arg Arg Phe Thr Ala Thr Ala

20 25 30

Thr Thr Ile Thr Thr Thr Ile Thr Thr Ser Pro Ala Ile Gln Ile

35 40 45

Arg Gln Leu Leu Ile Ser Cys Ala Glu Leu Ile Ser Gln Ser Asp Phe

50 55 60

Ser Ala Ala Lys Arg Leu Leu Thr Ile Leu Ser Thr Asn Ser Ser Pro

65 70 75 80

29 / 31

Phe Gly Asp Ser Thr Glu Arg Leu Val His Gln Phe Thr Arg Ala Leu

85

90

95

Ser Leu Arg Leu Asn Arg Tyr Ile Ser Ser Thr Thr Asn His Phe Met

100

105

110

Thr Pro Val Glu Thr Thr Pro Thr Asp Ser Ser Ser Ser Ser Leu

115

120

125

Ala Leu Ile Gln Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Asn Gln Val Thr Pro Phe

130

135

140

Ile Arg Phe Thr Gln Leu Thr Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Ile

145

150

155

160

Asn Gly Asn His Gln Ala Ile His Ile Val Asp Phe Asp Ile Asn His

165

170

175

Gly Val Gln Trp Pro Pro Leu Met Gln Ala Leu Ala Asp Arg Tyr Pro

180

185

190

Ala Pro Thr Leu Arg Ile Thr Gly Thr Gly Asn Asp Leu Asp Thr Leu

195

200

205

Arg Arg Thr Gly Asp Arg Leu Ala Lys Phe Ala His Ser Leu Gly Leu

30 / 31

210 215 220

Arg Phe Gln Phe His Pro Leu Tyr Ile Ala Asn Asn Asn His Asp His

225 230 235 240

Asp Glu Asp Pro Ser Ile Ile Ser Ser Ile Val Leu Leu Pro Asp Glu

245 250 255

Thr Leu Ala Ile Asn Cys Val Phe Tyr Leu His Arg Leu Leu Lys Asp

260 265 270

Arg Glu Lys Leu Arg Ile Phe Leu His Arg Val Lys Ser Met Asn Pro

275 280 285

Lys Ile Val Thr Ile Ala Glu Lys Glu Ala Asn His Asn His Pro Leu

290 295 300

Phe Leu Gln Arg Phe Ile Glu Ala Leu Asp Tyr Tyr Thr Ala Val Phe

305 310 315 320

Asp Ser Leu Glu Ala Thr Leu Pro Pro Gly Ser Arg Glu Arg Met Thr

325 330 335

Val Glu Gln Val Trp Phe Gly Arg Glu Ile Val Asp Ile Val Ala Met

340 345 350

31 / 31

Glu Gly Asp Lys Arg Lys Glu Arg His Glu Arg Phe Arg Ser Trp Glu

355

360

365

Val Met Leu Arg Ser Cys Gly Phe Ser Asn Val Ala Leu Ser Pro Phe

370

375

380

Ala Leu Ser Gln Ala Lys Leu Leu Leu Arg Leu His Tyr Pro Ser Glu

385

390

395

400

Gly Tyr Gln Leu Gly Val Ser Ser Asn Ser Phe Phe Leu Gly Trp Gln

405

410

415

Asn Gln Pro Leu Phe Ser Ile Ser Ser Trp Arg

420

425

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13375

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/29, C12N15/09, C12N5/14, A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/29, C12N15/09, C12N5/14, A01H5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), WPI (DIALOG),  
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Bolle C. et al., PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction, Genes Dev. (2000 May), Vol.14, No.10, pages 1269 to 1278	1-13
A	Vishnevetsky M. et al., CHRC, encoding a chromoplast-specific carotenoid-associated protein, is an early gibberellic acid-responsive gene., J.Biol. Chem. (1997); Vol.272, No.40, pages 24747 to 24750	1-13
A	CHONO M. et al., cDNA cloning and characterization of a gibberellin-responsive gene in hypocotyls of Cucumis sativus L., Plant Cell Physiol. (1996), Vol.37, No.5, pages 686 to 691	1-13

 Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 03 March, 2003 (03.03.03)	Date of mailing of the international search report 18 March, 2003 (18.03.03)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Faxsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13375

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OGAWA M. et al., Gibberellin-responsive genes: high level of transcript accumulation in leaf sheath meristematic tissue from Zea mays L., Plant Mol.Biol. (1999), Vol.40, No.4, pages 645 to 657	1-13
A	van der Knaap E. et al., Transcript level for a gene encoding a putative type Ia plasma membrane receptor is induced by gibberellin in deepwater rice., Plant.Cell.Physiol. (1998), Vol.39, No.11, pages 1127 to 1132	1-13
A	K. WASHIO, et al., Identification of Dof proteins with implication in the gibberellin-regulated expression of a peptidase gene following the germination of rice grains., Biochim.Biophys. Acta. (2001 Jul.), Vol.1520, No.1, pages 54 to 62	1-13

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12N15/29, C12N15/09, C12N5/14, A01H5/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12N15/29, C12N15/09, C12N5/14, A01H5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

Swiss Prot/PIR/GeneSeq, MEDLINE(STN), WPI(DIALOG),  
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Bolle C, et.al., PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction., Genes Dev. (2000 May), Vol. 14, No. 10, p. 1269-1278	1-13
A	Vishnevetsky M, et.al., CHRC, encoding a chromoplast-specific carotenoid-associated protein, is an early gibberellin acid-responsive gene., J Biol Chem. (1997), Vol. 272, No. 40, p. 24747-24750	1-13

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 03.03.03	国際調査報告の発送日 18.03.03
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 鈴木 美葉子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488 4N 9839 (印)

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Chono M, et. al., cDNA cloning and characterization of a gibberellin-responsive gene in hypocotyls of <i>Cucumis sativus</i> L., <i>Plant Cell Physiol.</i> (1996), Vol. 37, No. 5, p. 686-691	1-13
A	Ogawa M, et. al., Gibberellin-responsive genes: high level of transcript accumulation in leaf sheath meristematic tissue from <i>Zea mays</i> L., <i>Plant Mol Biol.</i> (1999), Vol. 40, No. 4, p. 645-657	1-13
A	van der Knaap E, et. al., Transcript level for a gene encoding a putative type 1a plasma membrane receptor is induced by gibberellin in deepwater rice., <i>Plant Cell Physiol.</i> (1998), Vol. 39, No. 11, p. 1127-1132	1-13
A	K. WASHIO, et. al., Identification of Dof proteins with implication in the gibberellin-regulated expression of a peptidase gene following the germination of rice grains., <i>Biochim Biophys Acta.</i> (2001 Jul), Vol. 1520, No. 1, p. 54-62	1-13